

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini yang digunakan yaitu metode eksperimental. Analisis perbandingan aktivitas antioksidan temulawak. Penelitian ini ekstraksi temulawak menggunakan metode maserasi dan ultrasonik dengan pelarut etanol 96% dan kontrol asam askorbat. Ekstrak kemudian di uji antioksidan menggunakan metode FRAP dilakukan secara triplo atau tiga kali pengulangan. Sampel melakukan uji standarisasi simplisia, skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan.

3.2. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian :

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dimulai Juli-Agustus 2024.

3.3. Sampel

Bahan baku yang digunakan sebagai sampel adalah rimpang temulawak yang diperoleh dari Desa Batujaya Kabupaten Karawang. Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol 96% simplisia rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhizal* Roxb) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) di Jl. Tentara Pelajar No.3. Cimanggu, Bogor, Jawa Barat, kemudian di dapatkan ekstrak kental dengan ekstraksi maserasi dan ekstraksi ultrasonik yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.4 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.4.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu ekstrak maserasi etanol 96% rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhizal* Roxb.), ekstrak ultrasonik etanol 96% rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhizal* Roxb.), asam klorida, dragendfroff, magnesium, FeCl_3 0,1%, triklorometana (CHCl_3), asetat anhidrat (CH_3CO)₂O, asam sulfat (H_2SO_4) Larutan FRAP, aquadest (bratako), ethanol absolute (smart-lab), asam trikloroasetat($\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$) (TCA)10% (EMSURE), feri klorida(FeCl_3) 0,1% (EMSURE) , kaliumferri sianida ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 1%, natrium hidroksida (NaOH)



(EMSURE) ,kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) (EMSURE) dan asam askorbat (Vitamin C).

3.4.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat, *rotary evaporator* (EYELA[®]), mortir, alat-alat gelas (PYREX[®]), labu ukur, neraca analitik, *spektrofotometer UV-Vis*, *ultrasonic cleaner*, micro pipet, vial coklat, corong, batang pengaduk, timbangan analitik digital, cawan penguap, kurs porselin, *water bath*, maserator, blender (Philips), spatel logam, dan penjempit kayu, loyang, tanur, desikator, hotplate, kaca arloji, *centrifuge* (PLC-025), oven (MENMERT[®]), desikator.

3.5 Variabel Penelitian

1. Klasifikasi variabel

a. Variabel Bebas

Konsentrasi etanol 96% merupakan variabel bebas dan ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhizal* Roxb.) ekstraksi maserasi dan ultrasonik dalam penelitian ini.

b. Variabel Terkait

Variabel terkait dari penelitian ini yang digunakan pengujian parameter standarisasi simplisia, skrining fitokimia, dan aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol temulawak (*Curcuma xanthorrhizal* Roxb) ekstraksi maserasi dan ultrasonik dalam penelitian ini.

2. Definisi operasional variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas					
1.	Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak Ekstraksi Maserasi	Ekstrak kental yang terbuat dari simplisia temulawak yang diekstraksi dengan etanol 96% untuk	Observasi	Nominal	%

		memperoleh rendemen ekstrak.			
2.	Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak Ekstraksi Ultrasonik	Ekstrak kental yang terbuat dari simplisia temulawak yang diekstraksi dengan etanol 96% untuk memperoleh rendemen ekstrak.	Observasi	Nominal	%

Variabel Terikat

3.	Skrinning Fitokimia Alkaloid	Adanya aktivitas senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya warna merah bata, merah setelah penambahan reagen <i>Dragendroff</i> , dan terbentuknya endapan putih atau kekuningan setelah penambahan reagen <i>Mayer</i> .	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
4.	Skrinning Fitokimia Flavonoid	Adanya aktivitas senyawa Flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna merah atau jingga.	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
5.	Skrinning Fitokimia Saponin	Adanya aktivitas senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya busa dalam kurun waktu 10 menit dengan ketinggian busa 1-3 cm.	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
6.	Skrinning Fitokimia Tanin	Adanya aktivitas senyawa tanin ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi hijau	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif

		kehitaman atau biru tua.			
7.	Skrinning Fitokimia Steroid dan Triterpenoid	Adanya aktivitas senyawa steroid dan triterpenoid ditandai dengan terbentuknya perubahan warna biru kehijauan menandakan adanya kandungan steroid, dan warna ungu menandakan adanya kandungan triterpenoid.	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
8.	Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak Ekstraksi Maserasi	Aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol rimpang temulawak (<i>Curcuma xanthorrhizal Roxb</i>) dilakukan menggunakan metode FRAP dengan mengukur nilai absorbansinya	Spektrofo Metri UV-Vis	Rasio	Ppm (per part million)
9.	Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak Ekstraksi Ultrasonik	Aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol rimpang temulawak (<i>Curcuma xanthorrhizal Roxb</i>) dilakukan menggunakan metode FRAP dengan mengukur nilai absorbansinya	Spektrofo Metri UV-Vis	Rasio	Ppm (per part million)

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan untuk memastikan keadaan tumbuhan yang diteliti sesuai dengan identitas morfologi tumbuhan. Determinasi tanaman tuah temulawak (*Curcuma xanthorrhizal Roxb*) Sudah dilakukan di Universitas Padjadjaran

(UNPAD) tepatnya di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA.

3.6.2 Parameter Standarisasi Simplisia

3.6.2.1. Parameter Non Spesifik

a. Kadar Air

Metode kadar air yang digunakan adalah metode gravimetri. Sebanyak 2 gr simplisia dimasukkan ke dalam krus porselin yang kemudian dipanaskan pada suhu 105° C. Proses pemanasan dilakukan selama 30 menit dilanjutkan dengan 30 menit desikator dan di tara. Krus yang berisi simplisia kering dikeringkan pada suhu 105° C selama 5 jam dan di timbang. Kemudian dimasukkan kedalam desikator selama 15 menit dan ditimbang (Fikayuniar, Abriyani dan Aminah, 2021).

Adapun rumus kadar air adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

W_0 = Berat krus kosong

W_1 = Berat krus + sampel sebelum dioven

W_2 = Berat krus + sampel setelah dikeringkan

b. Kadar Abu Total

Ditimbang 2 gram simplisia kemudian dimasukkan kedalam krus silikat. Krus silikat sebelumnya dilakukan pemijaran, ditara, dan diratakan. Krus kosong ditimbang. Proses pemijaran dilakukan pada suhu 500-600° C selama 3 jam didalam tanur, dimasukkan kedalam desikator dedan ditimbang (Fikayuniar, Abriyani dan Aminah, 2021).

$$\text{Kadar abu total} = \frac{W_1 - W_0}{W_2 - W_0} \times 100\%$$

W_0 = Berat krus kosong

W_1 = Berat krus + sampel setelah diabukan

W_2 = Berat krus + sampel sebelum diabukan

c. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Pada proses kadar abu total telah didapatkan hasil kadar abu total. Abu tersebut didihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit.

Hasil yang tidak larut dalam asam disaring dan dihitung kadar abu tidak larut asam (Fikayuniar, Abriyani dan Aminah, 2021).

Rumus kadar abu tidak larut asam adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{w_1 - w_2}{w} \times 100\%$$

W = Berat sampel

W_1 = Berat krus + sampel setelah diabukan

W_2 = Berat kurs kosong

3.6.2.2. Parameter Spesifik

a. Kadar Sari Larut Air

5 gr simplisia ditimbang dan dimaserasi menggunakan air-klorofom didalam labu dan didiamkan selama 24 jam. Proses maserasi sesekali dikocok setiap jam kemudian dilakukan penyaringan. Diambil filtratnya sebanyak 20 mL kemudian diuapkan didalam cawan yang telah di tara. Hasil residu dipanaskan dengan oven suhu 105° C (Fikayuniar, Abriyani dan Aminah, 2021).

Adapun rumus kadar sari larut air adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{w_1 - w_2}{w_1 - w_0} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

b. Kadar Sari Larut Etanol

5 gr simplisia ditimbang dan dimaserasi menggunakan etanol 96% didalam labu dan didiamkan selama 24 jam. Proses maserasi sesekali dikocok setiap jam kemudian dilakukan penyaringan. Diambil filtratnya sebanyak 20 mL kemudian diuapkan didalam cawan yang telah di tara. Hasil residu dipanaskan dengan oven suhu 105° C (Fikayuniar, Abriyani dan Aminah, 2021).

Adapun rumus kadar sari larut etanol adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{w_1 - w_2}{w_1 - w_0} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

3.6.3 Ekstraksi Maserasi Ekstrak Etanol Temulawak (Curcuma xanthorrhizal Roxb)

Pelarut etanol 96% digunakan dalam proses ekstraksi dengan metode maserasi. 500 gram serbuk simplisia rimpang temulawak ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 5000 mL dan dilakukan maserasi. Setelah seluruh serbuk

direndam selama 3 hari atau 3x24 jam dan dilakukan pengadukan setiap 6 jam sekali. Setelah direndam selama 3 hari selanjutnya dilakukan proses penyaringan. Maserasi yang dihasilkan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator*. pada suhu 50° C dan diuapkan sampai menjadi ekstrak kental. (Ningsih *et al.*, 2020)

3.6.4 Ekstraksi Ultrasonik Ekstrak Etanol Temulawak (*Curcuma xanthorrhizal Roxb*)

Proses ekstraksi ultrasonik dilakukan dengan cara timbang 20 gram simplisia temulawak menggunakan timbangan analitik dan di tambahkan pelarut sebanyak 200 mL etanol 96% dengan perbandingan bahan : pelarut 1:10 . Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi ultrasonik dengan frekuensi 42 KHz dengan suhu 45° c selama 60 menit menggunakan alat *ultrasonic bath*. Ekstraksi diulang sebanyak 3 kali pengulangan. Hasil ekstrak disaring menggunakan corong *buchner* menghasilkan filtrat dan residu, filtrat pelarut ditampung dengan erlenmeyer, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. (Handayani *et al.*, 2016)

3.7 Skринning Fitokimia

1. Alkaloid

Timbang 0,5 gram ekstrak etanol dan masukkan kedalam tabung I, dan tabung II, kemudian tabung I, dan tabung II dimasukan masing-masing 0,5 mL asam klorida 2% sampai tercampur merata. Setelah itu tabung I ditambahkan reagen *Dragendroff* sebanyak 2-3 tetes, hingga terbentuknya warna merah bata, merah, jingga menandakan adanya alkaloid. Dan untuk tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen *Mayer* hingga terbentuknya endapan putih atau kekuningan pada tabung II menandakan adanya aktivitas senyawa alkaloid (Goa, Kopon dan Boelan, 2021).

2. Flavonoid

Ekstrak etanol kental temulawak dilarutkan dengan air mendidih hingga larut dan campuran tersebut kemudian disaring. Filtrat hasil pemanasan ditambahkan pita magnesium secukupnya bersamaan dengan 1 mL asam klorida pekat. Kemudian kocok kuat dan biarkan hingga memisah. Menghasilkan warna kuning,jingga sampai merah menunjukkan adanya flavonoid (Goa, Kopon dan Boelan, 2021).

3. Saponin

Didihkan aquadest dan larutkan ekstrak kental dalam beberapa ml air dalam tabung reaksi, kemudian disaring. Filtrat dari hasil pemanasan dikocok vertikal dengan kuat selama 10 detik. Apabila setelah proses pengocokan terbentuk buih-buih maka ditambahkan dengan HCl 1N, jika busa tidak hilang dalam kurun waktu 10 menit dengan ketinggian busa 1-3 cm akan terbentuk busa yang persisten maka ekstrak temulawak menunjukkan adanya golongan saponin (Goa, Kopon dan Boelan, 2021).

4. Tanin

Larutkan ekstrak dengan sedikit air panas, kemudian disaring dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan FeCl_3 1% dan akan terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru tua menunjukkan bahwa adanya tanin (Goa, Kopon dan Boelan, 2021).

5. Steroid dan Triterpenoid

Uji steroid dilakukan dengan mencampurkan 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrat dengan ekstrak kental temulawak. Lalu ditambahkan 1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya gugus triterpenoid ditunjukkan dengan adanya warna ungu, sedangkan terbentuknya warna biru-hijau menunjukkan adanya gugus steroid (Goa, Kopon dan Boelan, 2021).

3.8 Uji Antioksidan Dengan Metode FRAP

3.8.1 Pembuatan Larutan Pereaksi

1. Larutan Dapar Fosfat 0,2 M (pH 6,6)

Timbang NaOH sebanyak 0,2 gram dan dilarutkan dengan air bebas CO_2 hingga 250 mL dalam labu ukur, selanjutnya ditimbang KH_2PO_4 sebanyak 6,8 gram dan dilarutkan dengan aquadest bebas CO_2 hingga 250 mL dalam labu ukur. Larutan NaOH dipipet sebanyak 16,4 mL, dimasukkan dalam labu ukur dan dicampurkan 50 mL KH_2PO_4 dan dicukupkan dengan aquadest bebas CO_2 hingga 200 mL. Larutan tersebut, selanjutnya diukur sampai pH 6,6 (Issusilaningtyas *et al.*, 2023)

2. Larutan Kalium Ferrisianida ($K_3Fe(CN)_6$) 1%

Timbang 1 gram kalium ferrisianida ($K_3Fe(CN)_6$) dan dilarutkan dengan aquadest bebas CO_2 dalam labu ukur 100 mL. (Issusilaningtyas *et al.*, 2023)

3. Larutan Besi Klorida (III) ($FeCl_3$) 0,1 %

Timbang 0,1 gram besi klorida (III) ($FeCl_3$) dan dilarutkan dengan aquadest bebas CO_2 dalam labu ukur 100 mL. (Issusilaningtyas *et al.*, 2023)

4. Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10 %

Timbang 10 gram asam trikloroasetat (TCA) dan dilarutkan dengan aquadest bebas CO_2 dalam labu ukur 100 mL. (Issusilaningtyas *et al.*, 2023)

A. Uji Aktivitas Antioksidan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

1). Pembuatan Larutan Induk Vitamin C

Larutan stok 100 ppm disiapkan dengan cara menimbang 10 mg vitamin c (asam askorbat) dan dilarutkan dengan etanol p.a, dicukupkan hingga tanda batas labu ukur 10 ml. (Wassalwa *et al.*, 2016)

2). Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Panjang gelombang maksimum diperoleh melalui pengukuran absorbansi dari larutan standar vitamin c pada konsentrasi 3 ppm. Dipipet sebanyak 1 ml, larutan dicampurkan dengan 1 mL dapar fosfat (pH 6,6) lalu 1 ml kalium ferrisianida 1% ke dalam tabung reaksi, campuran divortex selama \pm 3 menit kemudian diinkubasi pada suhu $50^\circ C$ selama 20 menit. Setelah selesai diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA, kemudian larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Ambil 1 ml bagian lapisan atas, dan tambahkan 1 ml aquadest dan 0,5 ml $FeCl_3$ ke dalam labu ukur 5 ml cukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400-800 hingga memperoleh panjang gelombang maksimum (Hasyim *et al.*, 2023)

3). Penetapan Operating Time

Setelah menentukan panjang gelombang maksimal, dilakukan pengujian waktu operasi untuk menentukan saat di mana reaksi paling stabil. Absorbansi diukur dari menit pertama hingga menit ke-30. (Rahayu *et al.*, 2021)

4). Pembuatan Larutan Vitamin C sebagai pembanding

Timbang 10 mg vitamin C, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a di dalam labu ukur 10 ml sampai tanda batas. Lalu pipet masing-masing larutan 0,05 ml, 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, dan 0,25 ml dari larutan induk vitamin c ke dalam labu ukur 5 ml dan dicampur dengan etanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan variasi konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm. Dipipet sebanyak 1 ml, larutan dicampurkan dengan 1 mL dapar fosfat (pH 6,6) dan 1 ml kalium ferrisianida 1% ke dalam tabung reaksi, campuran divortex selama ± 3 menit kemudian diinkubasi pada suhu 50° C selama 20 menit. Setelah selesai diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA, kemudian larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Ambil 1 ml bagian lapisan atas, dan tambahkan 1 ml aqudest dan 0,5 ml FeCl₃ ke dalam labu ukur 5 ml cukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 5-10 menit, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang maksimal. (Purwanto *et al.*, 2017).

5). Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 1 ml dapar fosfat pH 6,6 ditambahkan 1 ml kalium ferrisianida 1% ke dalam tabung reaksi, campuran divortex selama ± 3 menit kemudian diinkubasi pada suhu 50° C selama 20 menit. Setelah selesai diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA 10%, kemudian larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Ambil 1 ml bagian lapisan atas, dan tambahkan 1 ml aqudest dan 0,5 ml FeCl₃ ke dalam labu ukur 5 ml cukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 692 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. (Tahir *et al.*, 2016)

6). Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Temulawak

Larutan stok 1000 ppm disiapkan dengan cara timbang sebanyak 25 mg ekstrak larutkan dengan etanol pa ke dalam labu ukur 25 ml sampai tanda batas. (Septiani *et al.*, 2024).

7). Pengujian Antioksidan Ekstrak Temulawak

Timbang 25 mg ekstrak temulawak, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a di dalam labu ukur 25 ml sampai tanda batas. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm. Selanjutnya setiap konsentrasi dimasukkan kedalam labu ukur 5 ml dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 ml, larutan dicampurkan dengan 1 mL dapar fosfat (pH 6,6) dan 1 ml kalium ferrisianida 1% ke dalam tabung reaksi, campuran divortex selama \pm 3 menit kemudian diinkubasi pada suhu 50° C selama 20 menit. Setelah selesai diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA, kemudian larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Ambil 1 ml bagian lapisan atas, dan tambahkan 1 ml aqudest dan 0,5 ml FeCl₃ ke dalam labu ukur 5 ml cukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 5-10 menit, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 720 nm. (Vijayalakshmi dan Ruckmani,2016)

8). Penentuan Nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol temulawak dengan metode perendaman radikal bebas FRAP dihitung dengan menentukan *Inhibitory Concentration 50* (IC₅₀). Dalam menentukan IC₅₀ maka mesti ditentukan persen perendaman, kemudian tentukan nilai probit untuk setiap persen perendaman, kemudian dihasilkan persamaan regresi linear dari hubungan antara konsentrasi logaritmik masing-masing ekstrak dengan setiap nilai probit ($y = bx + a$). Nilai IC₅₀ mewakili konsentrasi larutan sampel yang diperlukan untuk menghambat radikal bebas sebesar 50% dengan demikian mewakili aktivitas antioksidan larutan. (Abriyani *et al.*, 2023)

Tabel 3.2 Kategori Antioksidan Berdasarkan IC₅₀

Aktivitas	Nilai IC ₅₀
Sangat Aktif	< 50 ppm
Aktif	50-100 ppm
Sedang	100-250 ppm
Lemah	250-500 ppm
Tidak Aktif	>500 ppm

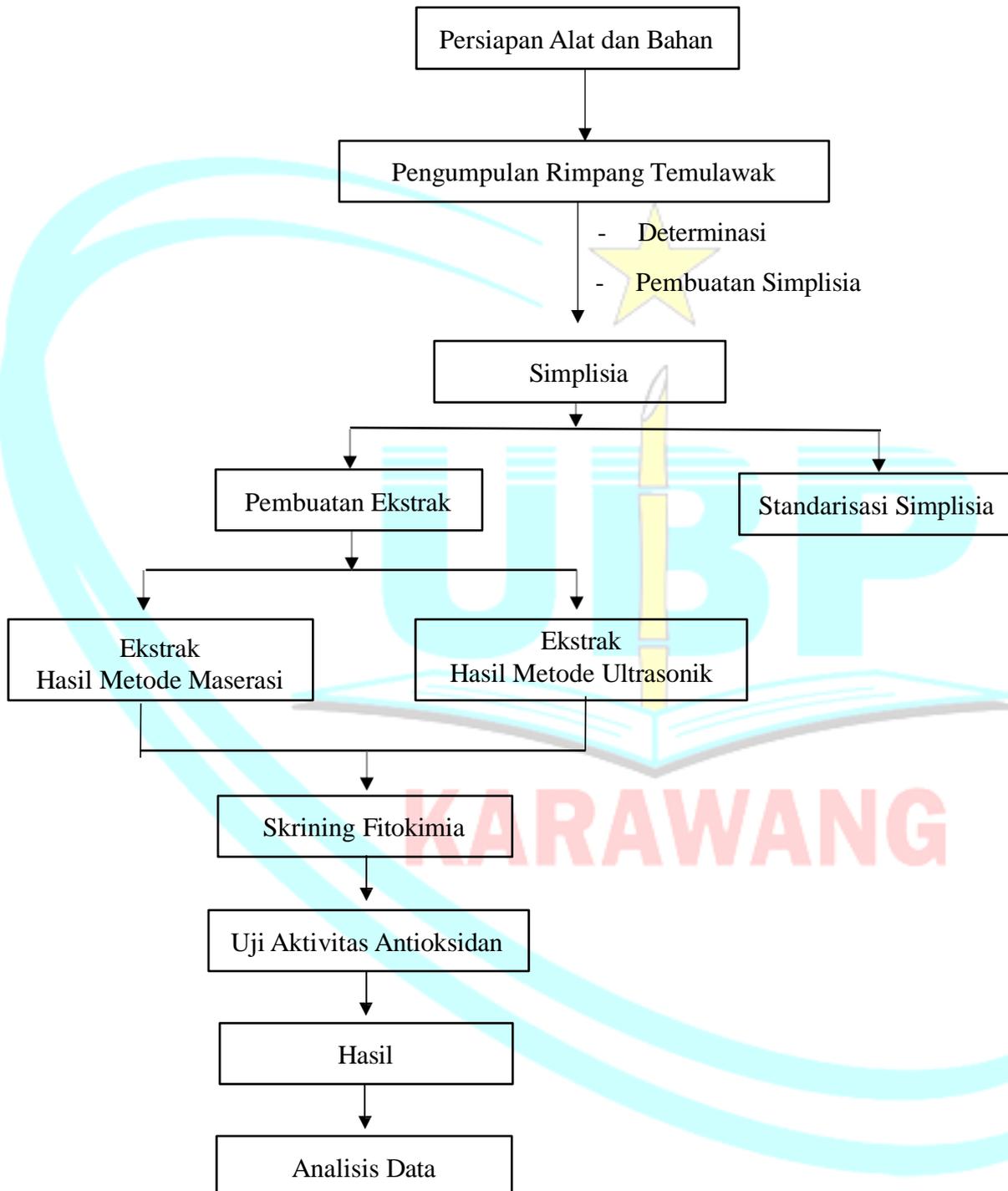
$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

3.8 Analisis Data

Uji aktivitas antioksidan ekstraksi maserasi dan ultrasonik temulawak kemudian dianalisis menggunakan pengolahan data SPSS dengan metode uji statistik one-way ANOVA untuk membandingkan aktivitas antioksidan.

KARAWANG

3.9 Diagram alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian