

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan dan Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Pelaksanaan penelitian ini dengan melalui beberapa tahapan yakni tahapan persiapan sampel, ekstraksi bahan serta uji antioksidan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (M.Khoirunisa.2019).

3.2 Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2024 bertempat di laboratorium fakultas farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dengan alamat di jalan Jl. H.S. Ronggowaluyo, Teluk Jambe, Karawang. Desa/Kelurahan, Sirnabaya.

3.3 Sampel

Sampel penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% bubuk kunyit (*Curcuma domestica Val*) yang akan dilakukan proses pembuatan simplisia, dan diekstraksi maserasi. Tumbuhan kunyit (*Curcuma domestica Val*) berasal dari Labansari Kabupaten Bekasi, Provinsi Jawa Barat.

3.4 Alat Dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini neraca analitik, gelas ukur, tabung reaksi alat gelas, beaker glass, gelas ukur, water bath, kain hitam, blender, batang pengaduk, tabung reaksi, water bath, rotary evaporator, spektrofotometer UV-Vis, mikropipet. toples kaca kedap udara, batang pengaduk, Plat KLT, Chamber KLT, lampu UV, penutup kaca, lampu bunsen, cawan penguap, kurs porselin, tanur, oven, desikator, pipet tetes, Hot Plate, labu ukur, pipa kapiler, chamber, kertas saring, corong, erlenmeyer.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kunyit (*Curcuma domestica Val*) segar, bubuk kunyit yang telah dihasilkan dari proses pengeringan, ABTS (2,2-Azinobis(3- ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid), kalium persulfat (K₂S₂O₈),

vitamin C, etanol, aquadest, etanol 70%, serbuk magnesium, asam klorida pekat, FeCl₃, NaOH, Kloroform, H₂SO₄ dan asam askorbat.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variabel

3.5.1.1 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan pada kunyit (*Curcuma domestica Val*).

3.5.1.2 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol pada kunyit (*Curcuma domestica Val*) yang telah dilakukan proses pengeringan dengan tiga teknik perlakuan hingga proses penepungan.

3.5.1.3 Variabel Kontrol

Variabel Kontrol dalam penelitian ini adalah pelarut, pereaksi, perubahan warna, eluen, nilai R_f, nilai IC₅₀.

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

NO	Jenis Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel bebas					
1	Ekstraks etanol bubuk kunyit teknik pengeringan sinar matahari langsung (X1)	Ekstrak bubuk kunyit dinyatakan dalam satuan persen %. Ekstrak etanol bubuk kunyit dalam penelitian ini dengan maserasi bubuk kunyit hasil pengeringan	Neraca	Nominal	Kadar rendeman ekstrak etanol bubuk kunyit (%)

NO	Jenis Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil Ukur
2	Ekstraksi etanol bubuk kunyit dengan teknik pengeringan menggunakan freezer dry.(X2)	teknik matahari langsung dengan etanol 70% untuk memperoleh rendeman ekstrak Ekstrak etanol bubuk kunyit dinyatakan dalam persen (%).Ekstrak etanol bubuk kunyit dalam penelitian ini didapat dari maserasi bubuk kunyit hasil pengeringan teknik <i>freezer dry</i> etanol 70% untuk memperoleh rendeman ekstrak			Kadar rendeman ekstrak etanol bubuk kunyit (%)
3	Ekstraksi etanol bubuk kunyit dengan teknik pengeringan menggunakan Oven	Ekstrak etanol bubuk kunyit dinyatakan dalam persen (%).Ekstrak etanol bubuk kunyit dalam penelitian ini			Kadar rendeman ekstrak etanol bubuk kunyit (%)

NO	Jenis Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil Ukur
		didapat dari maserasi bubuk kunyit hasil pengeringan teknik menggunakan oven dengan etanol 70% untuk memperoleh rendeman ekstrak			
Variabel Terikat					
4	Skrining fitokimia (Y1)	Skrining fitokimia adalah suatu uji awal untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat pada tanaman yang menjadi objek penelitian yakni pada kunyit	Panca indra	Nominal	Positif /Negatif kunyit mengandung sapomin, Tanin. Alkaloid, Flavonoid, Steroid dan Triterpenoid

NO	Jenis Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil Ukur
5	Aktivitas antioksidan (Y2)	Uji aktivitas antioksidan adalah secara kuantitatif dengan melakukan pengukuran penangkapan radikal bebas DPPH oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan, yang dinyatakan dengan nilai Inhibitory Concentration (IC50).	Spektrofotometri UV-Vis.	Ordinal	Hasil hitung kemampuan antioksidan dari ekstrak kunyit dengan katagori IC<50µg/mL Sangat kuat IC 50-100µg/mL katagori kuat, 100-250µg/mL, katagori lemah lebih dari 250µg/mL

3.5.3 Determinasi Tanaman

Pada proses awal penelitian ini adalah dilakukan identifikasi dan determinasi tumbuhan kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis yang terdapat dalam literature. Determinasi dilakukan di Universitas Padjajaran Bandung merupakan tempat dilakukanya penelitian, tepatnya di Laboratorium fakultas farmasi.

3.5.4 Penyiapan Simplisia

Tumbuhan kunyit (*Curcuma domestica Val*) diambil di daerah Laban Sari kabupaten Bekasi Jawa Barat Pengambilan sampel dilakukan dengan pilih biji kunyit (*Curcuma domestica Val*) sebanyak 1,5 kg kunyit segar lalu dibersihkan di air yang mengalir hingga tidak terdapat kotoran yang menempel pada biji kunyit. Kunyit 1,5 kg dibagi menjadi 3 bagian dengan masing masing 500 gr lalu di

potong melintang dengan ketebalan 0,3 cm. Lalu sampel 500 gr pertama diberi label P1 yang kemudian dilakukan pengeringan menggunakan sinar matahari langsung, 500 gr yang ke 2 dilakukan pemotongan melintang dengan ketebalan sama yakni 0,3 cm dilakukan pengeringan menggunakan sinar matahari dengan penutup kain berwarna hitam yang selanjutnya diberi label sebagai P2. Untuk 500 gr sisanya yang dilabeli sebagai P3 kunyit diiris melintang dengan ketebalan 0,3 cm untuk dikeringkan menggunakan oven dengan suhu kontrol 65°C. Masing masing sampel baik p1 p2 maupun p3 dilakukan proses pengeringan.

Proses pengeringan tersebut dihentikan sampai kadar air rimpang kunyit sebesar 12% (rimpang kering bisa dipatahkan) yang mengacu pada Depkes RI (1985). Pengujian kadar air dilakukan dengan pengambilan sampel secara acak dengan menggunakan metode thermovolumetri (Sudarmajdi et al. 1997).

lalu dikumpulkan kemudian disimpan di dalam wadah, selanjutnya proses pencucian menggunakan air bersih yang mengalir sampai kunyit benar-benar terbebas dari kotoran maupun benda asing, lakukan proses perajangan dengan memotong daun dengan ukuran yang sama.

Proses pengeringan tersebut dihentikan sampai kadar air rimpang kunyit sebesar 12% (rimpang kering bisa dipatahkan) yang mengacu pada Depkes RI (1985). Pengujian kadar air dilakukan dengan pengambilan sampel secara acak dengan menggunakan metode thermovolumetri (Sudarmajdi et al. 1997).

Proses penepungan simplisia kunyit dilakukan dengan menggunakan mesin blander untuk mendapatkan bubuk kunyit. Selanjutnya proses ekstraksi dilakukan dengan metode yang mengacu pada Agung Adi Nugroho (2015) Ekstraksi kunyit dilakukan dengan cara maserasi dengan perbandingan bahan dan pelarut 1: 5 (b/v) selama 1 x 24 jam pada suhu ruang (28-30°C) dan dilakukan pengadukan sebanyak 20 kali dengan arah pengadukan searah jarum jam. Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi rimpang kunyit adalah etanol 70%.

3.5.5 Parameter Standarisasi Simplisia

3.5.5.1 Standarisasi Non Spesifik

1. Kadar Air

Penetapan kadar air dengan metode gravimetri dilakukan dengan memanaskan kurs porselin dipanaskan di dalam oven dalam suhu 105°C selama 30 menit, lalu didinginkan kedalam desikator selama 30 menit dan telah ditara (ditimbang), serbuk simplisia ditimbang sebanyak 2 gram dalam kurs porselin, sampel dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Masukkan kurs porselin kedalam desikator selama 15 menit dan ditimbang (Supomo et al., 2016). Rumus Kadar air dihitung (SNI, 2013) :

$$\text{Kadar Air} = \frac{w_1 - w_2}{w_1 - w_0} \times 100\%$$

Keterangan =

W0 = Berat kurs kosong

W1 = Berat kurs + sampel sebelum dioven

W2 = Berat kurs + sampel setelah dikeringkan setelah dioven

2. Kadar Abu

Simplisia 2 gram ditimbang dan dimasukkan kedalam kurs porselin yang telah ditara dan dipijarkan terlebih dahulu, kemudian diratakan, kurs dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dan didinginkan. pijarkan dilakukan pada suhu 500-600 °C menggunakan tanur selama 3 jam, kemudian hasil pemijaran didinginkan dalam desikator, serta ditimbang berat abu (Supomo et al., 2016). Rumus Kadar Abu Total (SNI, 2013) :

$$\text{Kadar Abu} = \frac{w_1 - w_0}{w_2 - w_0} \times 100\%$$

Keterangan =

W0 = Berat kurs kosong

W1 = Berat kurs + sampel sebelum diabukan

W2 = Berat kurs + sampel setelah diabukan

3. Kadar Abu tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh, didihkan dengan 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas

abu, dicuci dengan air panas, tempatkan kembali kertas saring dan isi kedalam cawan, uapkan diatas penangas air, kemudian panaskan dalam tanur pada suhu 525 dalam waktu 3 jam, kemudian diidnginkan pada desikator selama 30 menit. (SNI, 2013; Supomo, 2016). Rumus Kadar Abu Tidak Larut Asam :

$$KATLASam = \frac{\text{berat abu yang tidak larut asam}}{\text{berat abu awal}} \times 100\%$$

3.5.5.2 Parameter Spesifik

1. Kadar Sari Larut Air

Sejumlah 5 gram simplisia dimaserasi didalam labu Erlenmeyer selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform (2,5 mL kloroform dalam aquades 1000 mL). Campuran sesekali dikocok tiap jam, selama 6 jam pertama dan didiamkan selama 18 jam, kemudian disaring. 20 ml filtrate diuapkan diatas penangas air hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara (Saifudin et al., 2011). Residu dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung dengan rumus (Supomo et al., 2016)

$$KSLA = \frac{\text{berat sari laut etanol}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100 \%$$

2. Kadar Sari Larut Etanol

Sejumlah 5 gram simplisia dimaserasi kedalam labu Erlenmeyer dengan 100 mL Etanol 96 %. Campuran sesekali di kocok selama 6 jam dan didiamkan selama 18 jam. Sample disaring dengan cepat menghindari penguapan etanol, kemudian 20 ml filtrate diuapkan diatas penangas air hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara (Saifudin et al., 2011). Residu dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol 96 % dihitung terhadap berat ekstrak awal dengan rumus (Supomo et al., 2016)

$$KSLE = \frac{\text{berat sari etanol}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100 \%$$

3.5.6 Proses Maserasi Kunyit (*Curcuma domestica Val*)

Ekstraksi kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan metode maserasi menggunakan pelarut Etanol 70%. Perbandingan pada maserasi simplisia dan pelarut 1000 gram dalam 10.000 mL (Padmasari et al., 2016). Ekstraksi kunyit

serbuk simplisia timbang masing-masing 1000 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan tambahkan Etanol 70% 10.000 mL selama 3 hari, lalu ampas di maserasi kembali dengan 1000 mL etanol 70% selama 2 hari. Setiap perlakuan sesekali ekstrak diaduk setiap 6 jam sekali. Filtrate kemudian disaring menggunakan corong buchner. Filtrat yang didapatkan setelah itu diuapkan dengan vacum rotary evaporator dengan suhu 50-60°C. Ekstrak diuapkan menggunakan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental (Aryahidayani, 2020).

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{Bobot Ekstra}}{\text{Bobot Simplisia Kering}} \times 100 \%$$

Proses ekstraksi dilakukan pada masing masing sampel yakni pada simplisia kunyit yang dikeringkan dengan metode pengeringan dibawah matahari secara langsung, dan bubuk simplisia kunyit yang dikeringkan melalui metode dijemur dibawah matahari dengan penutup kain hitam dan simplisia dengan metode pengeringan menggunakan oven, proses ekstraksi ini untuk mengetahui optimasi masing masing metode pengeringan kunyit terhadap aktivitas antioksidan.

3.5.7 Skrining Fitokimia

Uji fitokimia senyawa aktif dengan uji reagen ekstrak pekat aquades dilarutkan dengan sedikit ekstrak pada pelarut. Kemudian dilakukan uji sebagai berikut :

a. Uji Saponin

Ekstrak ramuan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit. Apabila menimbulkan busa ditambahkan HCl 1 N, busa yang terbentuk dapat bertahan selama ± 10 menit maka ekstrak positif mengandung saponin.

b. Uji Tanin

dengan gelatin ekstrak ramuan ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan gelatin. Jika larutan menghasilkan endapan putih maka bahan tersebut mengandung tanin.

c. Flavonoid

Ekstrak dilarutkan dalam 1-2 ml aquades panas 50% Setelah itu ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid

3.5.8 Uji Antioksidan

Setelah proses ekstraksi selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan pada masing masing sampel yakni untuk mengetahui optimasi masing masing metode pengeringan kunyit terhadap aktivitas antioksidan. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (*1,1 Diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Langkah utama yakni dengan:

1. Menyiapkan Larutan Stock DPPH

Menimbang 2.5 mg DPPH lalu dilarutkan dalam 50 ml metanol pa yang lalu dihomogenkan dan dilapisi dengan alumunium foil sehingga didapat larutan stock DPPH dengan konsentrasi 500ppm.

2. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH 500 ppm dipipet sebanyak 2 mL ditambahkan dengan metanol pa sebanyak 2 mL homogenkan lalu diinkubasi selama 30 menit.

3. Penentuan Panjang Gelombang

Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan memipet 4 mL kedalam kuvet, kemudian ditentukan spektrum serapan dengan spektrometer UV –Vis pada panjang gelombang 400-800 nm dan ditentukan panjang gelombang optimum nya.

4. Penentuan Serapan Absorbansi

Larutan DPPH 2 milimeter ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 2 mL kedalam botol coklat,lalu diinkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit, kemudian di lakukan pengukuran spektrometer UV-Vis pada panjang gelombang 518 nm pada ruang tertutup dan terhindar dari cahaya. Pengukuran serapan absorbansi dilakukan dengan 3 kali replika.

5. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Asam askorbat ditimbang 2,5 milligram (mg), kemudian dilarutkan dalam metanol p.a 50 mililiter, dituangkan ke dalam labu ukur 25 mililiter sampai cukupkan dengan etanol sampai tanda . Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi

10 ppm, 8 ppm, 6 ppm, 4 ppm, 2 ppm (Indrawati et al., 2022). Setiap konsentrasi dilarutkan dalam 10 mililiter metanol p.a sampai tanda. Pindahkan 2 mililiter setiap larutan uji ke dalam botol coklat, dimasukkan ke dalam botol coklat, tambahkan 2 mililiter larutan DPPH, dan di homogen. Kemudian, diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya, serapan larutan uji dinilai spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 518 nm

6. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Kunyit 500 ppm

Larutan stok ekstrak kunyit dengan pelarut etanol 70% 500 ppm didapat dengan menimbang ekstrak etanol kental kunyit dari masing masing teknik pengeringan sebanyak 25 mg dan dilarutkan dengan etanol kemudian dihomogenkan, volume akhir dicukupkan dengan etanol sampai 50 ml kedalam volumetric dicukupkan volumenya sampai batas. Kemudian ekstrak disiapkan dengan konsentrasi 200 ppm, 125 ppm, 75ppm, 50ppm, 25 ppm. Pada setiap konsentrasi dipindahkan kedalam labu volumetric 10 mililiter dan tambahkan metanol p.a hingga mencapai tanda yang ditentukan.

7. Pengukuran Aktivitas antioksidan DPPH Pada Larutan Sampel

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kunyit (*Curcuma domestica Val*), dilakukan dengan cara memipet larutan induk ekstraksi sebanyak 2 mililiter masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan penambahan 2 mL larutan DPPH. Selanjutnya, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian dianalisis absorbansinya memakai spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm, dilakukan sebanyak 3 replikasi.

8. Penentuan Nilai IC-50

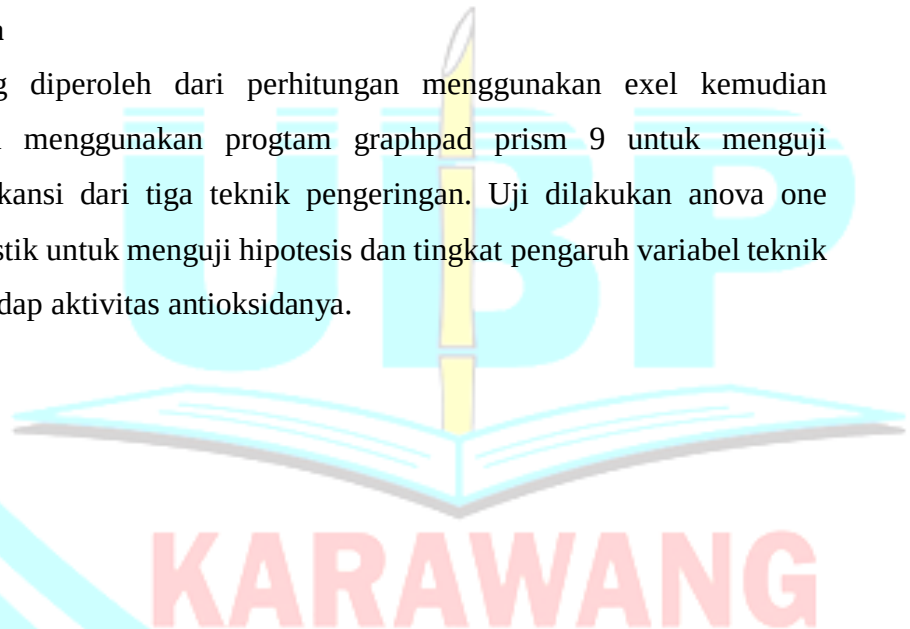
Penentuan nilai IC-50 diawali dengan menentukan presentase inhibisinya yakni presentase penghambatan aktivitas penangkapan radikal bebas. Persen inhibisi dari masing masing sampel dapat dihitung dengan persamaan rumus sebagai berikut:

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

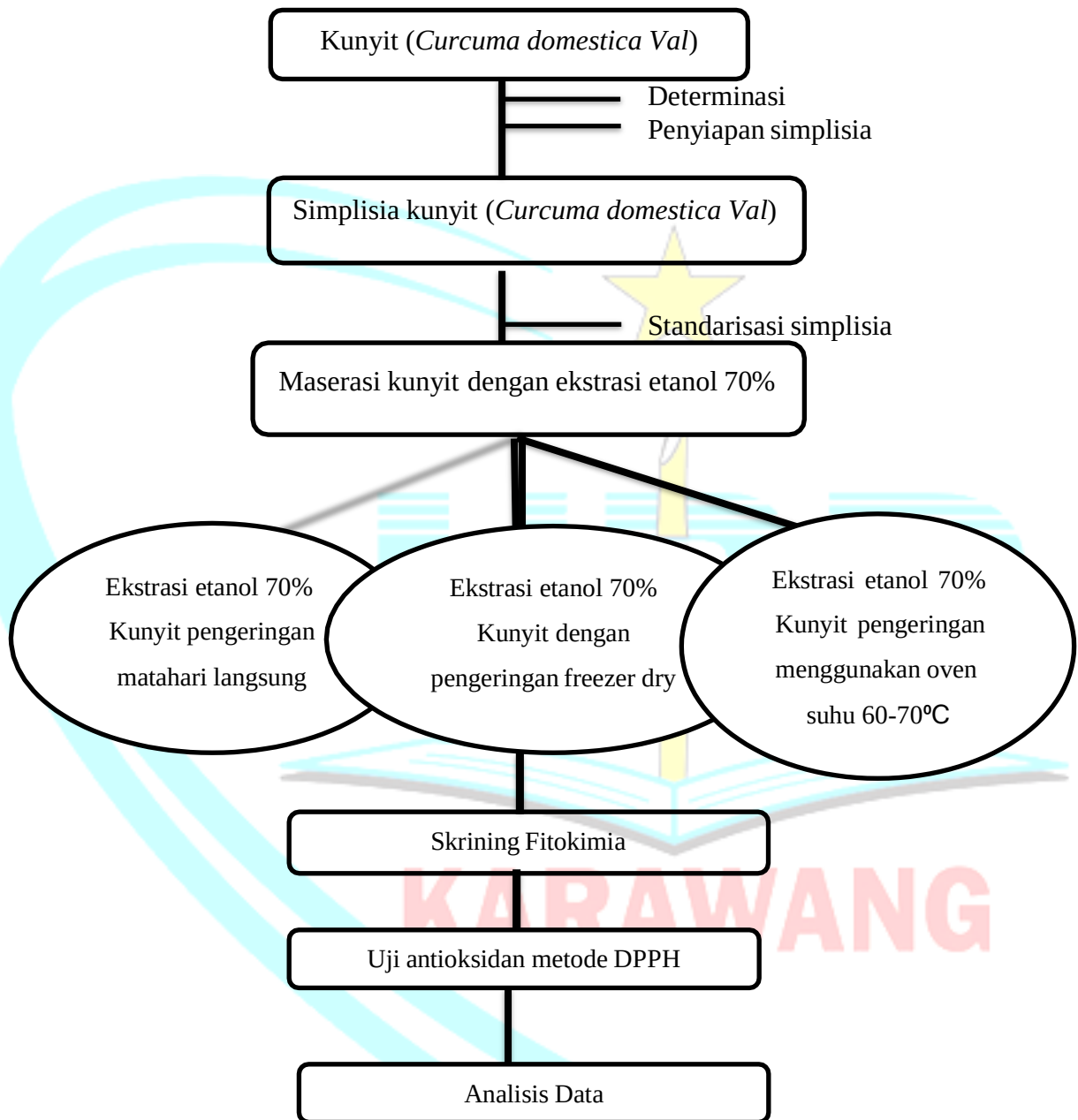
Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing –masing konsentrasi, konsentrasi sampel dalam persen inhibisi yang di dapat di plotkan masing-masing pada subu x dan y dalam persamaan regresi linear $y = a \pm bx$. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC50 dari masing-masing sampel. Nilai IC50 dari masingmasing sampel. Nilai IC50 adalah konsentrasi sampel yang dapat merendam nilai radikal bebas DPPH sebanyak 50% . IC50 merupakan besaran konsentrasi inhibisi suatu larutan uji dalam menurunkan aktivitas radikal bebas sebesar 50% dimana ketika nilai IC50 semakin kecil maka semakin besar pula aktivitas antioksidanya (Widyasanti aet al., 2016; Wulansari, 2018).

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari perhitungan menggunakan exel kemudian dianalisis dengan menggunakan progtam graphpad prism 9 untuk menguji perbedaan signifikansi dari tiga teknik pengeringan. Uji dilakukan anova one way. Analisis statistik untuk menguji hipotesis dan tingkat pengaruh variabel teknik pengeringan terhadap aktivitas antioksidanya.



3.7 Diagram Alir



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

