

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan studi eksperimental yang bertujuan untuk menguji optimasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dengan menganalisis pengaruh suhu pada metode pengeringan terhadap aktivitas antioksidan. Penelitian ini dapat menentukan kandungan antioksidan dalam curcuma kencur setelah menjalani proses pengeringan.

Penelitian ini mencakup tahapan pengumpulan dan pengeringan sampel, pengolahan rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn), serta pengujian aktivitas antioksidan. Terdapat tiga metode pengeringan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu pengeringan dengan sinar matahari langsung, sinar matahari langsung tanpa penutup kain hitam, dan menggunakan oven. Metode ini memungkinkan evaluasi efek setiap tahap pengeringan terhadap aktivitas antioksidan dalam rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn).

3.1.2 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian eksperimental, rancangan faktorial merupakan salah satu metode yang sangat efektif untuk menganalisis pengaruh dua atau lebih faktor terhadap suatu variabel respons. Pada konteks ini, faktor-faktor yang diamati meliputi suhu dan metode pengeringan, sedangkan variabel respons yang diukur adalah aktivitas antioksidan. Pendekatan ini memberikan keunggulan karena memungkinkan peneliti untuk menilai dampak masing-masing faktor secara individual, sekaligus menelaah interaksi yang mungkin terjadi di antara faktor-faktor tersebut.

Rancangan faktorial dirancang sedemikian rupa sehingga setiap kombinasi dari tingkat-tingkat faktor yang diteliti dapat diamati secara sistematis. Dengan demikian, peneliti dapat memperoleh gambaran yang komprehensif mengenai bagaimana perubahan suhu maupun variasi metode pengeringan mempengaruhi aktivitas antioksidan. Sebagai contoh, suhu pengeringan yang berbeda dapat

menyebabkan perubahan pada kandungan senyawa aktif, sementara metode pengeringan tertentu mungkin lebih efektif dalam mempertahankan atau bahkan meningkatkan aktivitas antioksidan. Melalui rancangan faktorial, peneliti dapat mengidentifikasi kombinasi optimal yang menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi.

Selain itu, keunggulan utama dari rancangan faktorial adalah kemampuannya untuk mengungkap adanya efek interaksi antar faktor. Efek interaksi ini terjadi ketika pengaruh suatu faktor terhadap variabel respons bergantung pada tingkat faktor lainnya. Misalnya, pengaruh suhu terhadap aktivitas antioksidan mungkin berbeda jika diterapkan pada metode pengeringan tertentu dibandingkan dengan metode pengeringan lainnya. Dengan demikian, rancangan faktorial tidak hanya memberikan informasi tentang efek tunggal setiap faktor, tetapi juga memperlihatkan dinamika hubungan antar faktor yang dapat memunculkan hasil yang tidak terduga.

Penggunaan rancangan faktorial dalam penelitian juga meningkatkan efisiensi eksperimen, karena sejumlah besar informasi dapat diperoleh dari jumlah percobaan yang relatif lebih sedikit dibandingkan dengan melakukan percobaan secara terpisah untuk setiap faktor. Hal ini sangat penting dalam penelitian ilmiah, terutama ketika sumber daya dan waktu menjadi pertimbangan utama.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian tugas akhir ini dilaksanakan dalam rentang waktu selama tiga bulan, yaitu dari bulan Juni hingga Agustus 2024. Seluruh kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang, yang beralamat di Jl. H.S. Ronggowaluyo, Telukjambe Timur, Karawang, Jawa Barat, dengan kode pos 41361. Pemilihan lokasi laboratorium ini didasarkan pada fasilitas yang memadai serta dukungan sumber daya manusia yang kompeten, yang sangat menunjang kelancaran dan keberhasilan proses penelitian.

Menurut pendapat para ahli dalam bidang penelitian ilmiah, pemilihan waktu dan tempat penelitian merupakan aspek krusial yang harus diperhatikan guna menjamin validitas dan reliabilitas hasil penelitian. Seperti yang diungkapkan oleh Sugiyono (2019), lingkungan laboratorium yang kondusif serta perencanaan waktu yang terstruktur sangat mempengaruhi kualitas data yang diperoleh. Dengan adanya

jadwal penelitian yang jelas dan fasilitas laboratorium yang lengkap, proses pengumpulan data dan analisis dapat dilakukan secara optimal tanpa hambatan berarti.

Selain itu, pelaksanaan penelitian di laboratorium yang terletak di Universitas Buana Perjuangan Karawang memberikan kemudahan akses terhadap peralatan modern dan teknologi terbaru yang diperlukan dalam penelitian farmasi. Hal ini sejalan dengan pandangan Nazir (2017) yang menekankan pentingnya dukungan fasilitas laboratorium yang memadai sebagai salah satu faktor penentu keberhasilan penelitian ilmiah, khususnya yang melibatkan analisis kimia dan uji bioaktivitas.

Selama periode penelitian, berbagai tahapan mulai dari persiapan bahan, proses ekstraksi, skrining fitokimia, hingga pengujian aktivitas biologis dilakukan secara sistematis dan terjadwal. Pendekatan ini tidak hanya memastikan setiap prosedur berjalan sesuai standar operasional yang berlaku, tetapi juga memberikan ruang bagi evaluasi dan perbaikan apabila ditemukan kendala teknis selama proses penelitian.

3.3 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian ini berupa ekstrak etanol 96% dari kencur (*Kaempferia galanga* Linn) yang akan melalui proses simplisia dan ekstraksi maserasi. Rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) diperoleh dari Sekebalingbing No. 8, Cikadut, Kec. Cimenyan, Kabupaten Bandung, Jawa Barat 40191.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ekstrak etanol 96% yang diperoleh dari tanaman kencur (*Kaempferia galanga* Linn). Proses persiapan sampel dimulai dengan pengolahan simplisia, yaitu bahan tanaman yang telah melalui tahap pengeringan dan persiapan awal, kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi. Metode maserasi dipilih karena kemampuannya yang efektif dalam mengekstraksi senyawa aktif dari rimpang kencur tanpa merusak kandungan bioaktif yang ada.

Rimpang kencur yang menjadi bahan baku utama dalam penelitian ini diperoleh dari lokasi Sekebalingbing No. 8, yang terletak di daerah Cikadut, Kecamatan Cimenyan, Kabupaten Bandung, Jawa Barat dengan kode pos 40191. Pemilihan lokasi ini didasarkan pada kualitas tanaman yang baik serta ketersediaan

bahan yang cukup melimpah, sehingga dapat memenuhi kebutuhan penelitian secara optimal. Selain itu, daerah ini dikenal memiliki kondisi lingkungan yang mendukung pertumbuhan tanaman kencur dengan kandungan senyawa aktif yang tinggi, menjadikannya sumber bahan baku yang ideal untuk penelitian.

Pengambilan rimpang kencur dilakukan dengan prosedur yang sesuai untuk menjaga kualitas bahan, dimulai dari proses penyortiran, pencucian, hingga pengeringan yang dilakukan secara hati-hati. Setelah simplisia siap, dilakukan ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96%, yang dikenal memiliki efektivitas tinggi dalam melarutkan berbagai senyawa bioaktif seperti flavonoid, saponin, dan alkaloid yang terkandung dalam kencur. Ekstraksi maserasi dilakukan dengan perendaman bahan dalam pelarut pada suhu ruang selama waktu tertentu, sehingga senyawa aktif dapat terekstraksi secara optimal tanpa mengalami degradasi akibat suhu tinggi.

Ekstrak yang diperoleh kemudian digunakan sebagai sampel utama dalam berbagai uji lanjutan, termasuk analisis kandungan fitokimia dan pengujian aktivitas biologis seperti aktivitas antioksidan. Dengan menggunakan ekstrak etanol 96% dari rimpang kencur yang berasal dari sumber terpercaya dan melalui proses ekstraksi yang terstandarisasi, penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan data yang valid dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

3.4 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.4.1 Alat

Dalam pelaksanaan penelitian ini, berbagai peralatan laboratorium digunakan untuk mendukung proses pengukuran, pengolahan, dan analisis sampel secara akurat dan efisien. Pemilihan alat-alat tersebut disesuaikan dengan tahapan penelitian yang melibatkan ekstraksi, pengeringan, pengukuran aktivitas antioksidan, serta proses pemurnian dan identifikasi senyawa bioaktif.

Salah satu alat utama yang digunakan adalah *neraca analitik*, yang berfungsi untuk menimbang bahan dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi, sehingga memastikan takaran bahan yang digunakan tepat sesuai dengan kebutuhan penelitian. Selain itu, alat-alat gelas seperti *gelas ukur*, *tabung reaksi*, *beaker glass*, *erlenmeyer*, dan *labu ukur* digunakan untuk menakar, mencampur, dan menampung larutan selama proses preparasi dan ekstraksi. Keberadaan alat gelas ini sangat

penting untuk menjaga keakuratan volume larutan dan kemurnian sampel.

Proses homogenisasi bahan dilakukan menggunakan *blender*, yang membantu menghaluskan bahan sehingga senyawa aktif lebih mudah diekstraksi. Untuk mengaduk larutan atau campuran, digunakan *batang pengaduk* yang terbuat dari bahan kaca atau plastik, memastikan pencampuran yang merata tanpa kontaminasi. Pada tahap penguapan pelarut, *rotary evaporator* digunakan untuk menghilangkan pelarut secara efisien dengan tekanan dan suhu yang dikontrol, sehingga senyawa aktif dapat dipisahkan tanpa mengalami degradasi.

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan *spektrofotometer UV-Vis*, alat yang mampu mengukur serapan cahaya pada panjang gelombang tertentu untuk menentukan konsentrasi senyawa aktif dalam sampel. Dalam proses pengambilan dan penanganan cairan, digunakan *mikropipet* dan *pipet tetes* untuk memastikan volume yang sangat kecil dapat diukur dengan presisi tinggi.

Selain itu, berbagai alat pendukung seperti *toples kaca kedap udara* digunakan untuk menyimpan sampel agar terlindungi dari kontaminasi dan kerusakan akibat oksidasi. *Penutup kaca* dan *corong* membantu dalam proses filtrasi dan penanganan sampel cair. Untuk proses pemanasan dan pengeringan, digunakan *oven*, *hot plate*, *lampu bunsen*, *tanur*, dan *kurs porselin*, yang memungkinkan pengaturan suhu secara tepat guna menghilangkan kelembaban tanpa merusak kandungan bioaktif.

Proses pengeringan dan penyimpanan juga melibatkan alat seperti *desikator*, yang menjaga kondisi kering dan bebas kelembaban pada sampel. Untuk pemisahan padatan dan cairan, digunakan *kertas saring* dan *chamber* sebagai ruang tertutup untuk berbagai reaksi kimia dan pengujian sampel. *Pipa kapiler* digunakan dalam teknik kromatografi dan pengambilan sampel mikro, sedangkan *water bath* berfungsi untuk memberikan suhu konstan pada proses inkubasi atau reaksi kimia.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan komponen utama yang mendukung proses ekstraksi, analisis, dan uji aktivitas biologis terhadap ekstrak kencur (*Kaempferia galanga* Linn). Pemilihan bahan-bahan tersebut didasarkan pada kebutuhan teknis dan fungsional dalam setiap tahap

penelitian, mulai dari persiapan sampel hingga pengujian aktivitas antioksidan dan identifikasi senyawa bioaktif.

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh melalui metode maserasi dengan pelarut etanol 95%. Penggunaan etanol pada konsentrasi tersebut dipilih karena kemampuannya yang baik dalam melarutkan berbagai senyawa bioaktif, termasuk flavonoid, alkaloid, dan senyawa fenolik lainnya yang terkandung dalam rimpang kencur. Etanol juga relatif aman dan mudah dihilangkan setelah proses ekstraksi selesai, sehingga cocok untuk aplikasi penelitian dan pengembangan produk herbal. Selain itu, aquadest (air destilasi) digunakan sebagai pelarut pelengkap dalam berbagai tahap pengenceran dan persiapan larutan, memastikan kemurnian dan konsistensi dalam analisis kimia.

Dalam proses uji aktivitas antioksidan, larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) yang diperoleh dari Aldrich digunakan sebagai reagen utama. DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang umum dipakai untuk mengukur kemampuan ekstrak dalam menangkap radikal bebas, sehingga menjadi indikator efektifitas antioksidan ekstrak kencur. Selain itu, berbagai pelarut organik seperti toluen, kloroform, etil asetat, n-heksan, dan metanol PA juga digunakan untuk melakukan fraksinasi dan pemisahan senyawa berdasarkan polaritasnya. Pelarut-pelarut ini membantu dalam mengisolasi senyawa-senyawa tertentu sehingga analisis fitokimia dan aktivitas biologis dapat dilakukan secara lebih spesifik dan terfokus.

Dalam uji identifikasi senyawa metabolit sekunder, digunakan sejumlah pereaksi kimia seperti HCl (asam klorida), amonia, ferri klorida (FeCl_3), gelatin, vanilin, serta pereaksi khusus untuk deteksi alkaloid seperti Dragendorff dan Mayer. Pereaksi-pereaksi ini memiliki fungsi penting dalam memberikan reaksi warna khas yang membantu mengkonfirmasi keberadaan golongan senyawa tertentu, seperti alkaloid, tanin, saponin, dan flavonoid. Penggunaan magnesium dan pereaksi Liebermann-Burchard juga mendukung identifikasi senyawa steroid dan triterpenoid yang terkandung dalam ekstrak.

Selain itu, bahan kimia seperti asam askorbat (Vitamin C) dan kalium hidroksida (KOH) digunakan sebagai standar dan pereaksi dalam pengujian aktivitas antioksidan serta dalam proses preparasi larutan. Asam askorbat berfungsi

sebagai kontrol positif dalam uji antioksidan karena aktivitasnya yang sudah dikenal luas, sedangkan KOH digunakan dalam proses pembuatan larutan basa dan dalam reaksi kimia tertentu yang memerlukan kondisi alkali.

3.5 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini, terdapat beberapa variabel sebagai berikut:

a. Variabel Independen

Variabel ini mencakup suhu yang digunakan dalam proses pengeringan rimpang kencur, Variabel ini mencakup metode pengeringan yang digunakan, seperti pengeringan oven 60°C, pengeringan *freeze dry* dan pengeringan sinar matahari langsung.

b. Variabel Dependen

Variabel ini merupakan respons dari penelitian yang merupakan ukuran dari aktivitas antioksidan rimpang kencur yang dihasilkan setelah proses pengeringan. Aktivitas antioksidan ini diukur menggunakan metode ABTS (2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonat)).

c. Variabel Kontrol

Untuk memastikan konsistensi dalam penelitian, jumlah curcuma kencur yang digunakan per percobaan harus tetap konstan. Variabel ini merujuk pada lama waktu yang dibutuhkan untuk proses pengeringan. Dalam penelitian ini, waktu pengeringan perlu dikontrol agar seragam di setiap perlakuan suhu dan metode pengeringan. Ukuran potongan rimpang kencur perlu dijaga seragam untuk meminimalkan variasi dalam proses pengeringan.

3.6 Definisi Operasional

Berikut merupakan definisi operasional dalam proposal yang disajikan dalam bentuk tabel dibawah ini:

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No	Jenis Variabel Bebas	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
1	Ekstrak Etanol 96% kencur dalam pengeringan sinar matahari langsung	Ekstrak Etanol 96% kencur dinyatakan dalam satuan presentase yang dihasilkan dengan maserasi jahe merah setelah pengeringan dibawah sinar matahari langsung	Neraca	Nominal	Efisiensi ekstraksi etanol 96% kencur (%)
2	Ekstraks Etanol 96% kencur metode pengeringan sinar matahari langsung tertutup kain hitam	Ekstrak etanol kencur dinyatakan dalam persen (%). Ekstrak etanol kencur ini didapat dari maserasi kencur hasil ekstrak pengeringan sinar matahari tertutupi kain hitam dengan etanol 96% ekstrak			Kadar rendaman ekstrak Etanol 96% kencur (%)
4	Skrining Fitokimia	Metode ini digunakan untuk mengidentifikasi senyawa kimia dalam ekstrak tumbuhan jahe merah dengan menggunakan pereaksi deteksi. Metode ini menentukan golongan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan terpenoid.	Panca Indra	Nominal	Positif /Negatif kencur mengandung saponin, Tanin, Alkaloid, Flavonoid, Steroid dan Triterpenoid

No	Jenis Variabel Terikat	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
3	Ekstraksi Etanol 96% kencur dengan metode pengeringan menggunakan alat oven	Ekstrak etanol kencur dinyatakan dalam persen (%). Ekstrak Etanol kencur dalam penelitian ini didapat dari maserasi kencur hasil metode pengeringan menggunakan oven dengan etanol 95% untuk memperoleh ekstrak			Kadar rendaman ekstrak Etanol 96% kencur (%)
5	Aktivitas antioksidan	Zat ini, baik alami maupun buatan, mampu mencegah atau memperlambat kerusakan sel yang disebabkan oleh proses oksidatif akibat oksidan.	DPPH	Ordinal	Hasil hitung kemampuan antioksidan dari ekstrak kencur dengan kategori IC ₅₀ Kuat: 50 - 100 µg/ml Sedang: 101 - 150 µg/ml Lemah: 151 - 200 µg/ml

3.7 Preparasi Sampel

3.7.1 Determinasi Tanaman

Proses determinasi tanaman merupakan tahap krusial dalam penelitian yang melibatkan identifikasi dan klasifikasi spesimen tumbuhan yang digunakan sebagai bahan penelitian. Pada penelitian ini, determinasi tanaman dilakukan secara sistematis dan akurat di unit laboratorium Biosistemika dan Molekuler, yang berada di Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Padjadjaran (UNPAD). Laboratorium ini memiliki fasilitas dan sumber daya yang memadai untuk mendukung proses identifikasi tanaman

secara ilmiah menggunakan pendekatan biosistematika dan teknik molekuler modern.

Pelaksanaan determinasi di laboratorium tersebut melibatkan penggunaan metode-metode taksonomi klasik yang didukung dengan analisis molekuler untuk memastikan tingkat keakuratan identifikasi. Metode biosistematika mengintegrasikan data morfologi, anatomi, serta karakteristik fisiologis dari tanaman, sementara pendekatan molekuler menggunakan teknik seperti analisis DNA barcoding untuk mengkonfirmasi identitas spesies secara genetik. Kombinasi kedua pendekatan ini sangat penting untuk mengatasi tantangan dalam mengidentifikasi tanaman yang memiliki kemiripan morfologi atau yang termasuk dalam kelompok taksonomi yang kompleks.

Selain itu, laboratorium Biosistematika dan Molekuler di Departemen Biologi FMIPA UNPAD juga didukung oleh tenaga ahli yang berpengalaman dalam bidang taksonomi tumbuhan dan biologi molekuler. Keahlian ini memungkinkan proses determinasi berjalan dengan teliti dan hasil yang diperoleh dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Prosedur determinasi mencakup pengumpulan data primer dari spesimen tanaman, pengamatan mikroskopis, serta analisis sekuen DNA untuk memastikan pengelompokan taksonomi yang tepat.

Hasil dari proses determinasi ini tidak hanya menjadi dasar penting dalam penelitian untuk memastikan bahwa bahan tanaman yang digunakan sesuai dengan spesies yang ditargetkan, tetapi juga berfungsi sebagai dokumentasi ilmiah yang dapat digunakan sebagai referensi dalam studi lanjutan. Penentuan spesies yang akurat sangat penting untuk menjamin validitas penelitian, terutama dalam studi yang berkaitan dengan kandungan kimia, aktivitas biologis, dan potensi aplikasi tanaman tersebut.

3.7.2 Penyiapan Simplisia

Tanaman *Kaempferia galanga* L. yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari lokasi Sekebalingbing No. 8, yang terletak di daerah Cikadut, Kecamatan Cimenyan, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Pemilihan lokasi ini didasarkan pada ketersediaan tanaman yang cukup melimpah serta kualitas bahan baku yang dianggap memenuhi standar penelitian. Setelah pengambilan, tanaman kencur tersebut menjalani serangkaian proses persiapan yang dilakukan dengan

cermat untuk menjaga kualitas dan kandungan bioaktifnya.

Proses awal dimulai dengan penyortiran basah, di mana tanaman yang telah dipanen diperiksa secara teliti untuk memisahkan bagian-bagian yang tidak memenuhi syarat, seperti bagian yang rusak, busuk, atau mengandung kotoran. Penyortiran ini bertujuan untuk memastikan bahwa hanya bahan yang berkualitas baik yang akan diproses lebih lanjut. Selanjutnya, bahan kencur dibersihkan menggunakan air mengalir secara menyeluruh untuk menghilangkan debu, tanah, dan kontaminan lain yang menempel pada permukaan rimpang. Setelah proses pencucian, bahan ditiriskan dengan baik agar kelebihan air dapat hilang, sehingga meminimalkan risiko pertumbuhan mikroorganisme selama tahap pengeringan.

Setelah tahap pembersihan, rimpang kencur diiris-iris menjadi potongan-potongan kecil untuk mempermudah proses pengeringan dan mempercepat penguapan air dari dalam jaringan tanaman. Pengeringan dilakukan menggunakan beberapa metode yang saling melengkapi untuk menjaga kestabilan senyawa aktif dalam bahan. Salah satu metode yang digunakan adalah *freeze drying* atau pengeringan beku, yang dilakukan dengan membekukan bahan terlebih dahulu kemudian menghilangkan air melalui proses sublimasi. Metode ini sangat efektif dalam mempertahankan struktur dan kandungan senyawa bioaktif karena berlangsung pada suhu rendah dan tekanan vakum.

Selain *freeze drying*, pengeringan juga dilakukan secara alami menggunakan sinar matahari yang dikombinasikan dengan penutupan menggunakan kain hitam. Penutupan ini bertujuan untuk mengurangi intensitas cahaya langsung yang dapat merusak senyawa sensitif sekaligus mencegah kontaminasi debu dan serangga. Metode pengeringan ini memanfaatkan panas alami dengan cara yang lebih lembut, sehingga menjaga kualitas bahan tetap optimal.

Selain itu, metode pengeringan menggunakan oven juga diterapkan dengan pengaturan suhu sekitar 60°C. Pengeringan dengan oven memberikan kontrol suhu yang lebih presisi dan konsisten, sehingga proses pengeringan dapat berlangsung lebih cepat dan efektif tanpa mengorbankan kualitas bahan. Kombinasi beberapa teknik pengeringan ini memberikan fleksibilitas dalam menjaga kestabilan dan kemurnian senyawa aktif pada rimpang kencur, yang sangat penting untuk keperluan ekstraksi dan analisis selanjutnya.

3.7.3 Pembuatan Ekstrak

Proses ekstraksi yang diterapkan dalam penelitian ini menggunakan metode *maserasi*, di mana simplisia diolah dengan pelarut etanol 96%. Pada tahap awal, setiap simplisia dimasukkan ke dalam alat *maserator*, kemudian ditambahkan pelarut dengan perbandingan rasio 1:10 (berat simplisia terhadap volume pelarut). Campuran tersebut kemudian diaduk secara homogen menggunakan *agitator* guna memastikan kontak yang maksimal antara bahan simplisia dan pelarut, sehingga memfasilitasi pelarutan senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia.

Setelah proses pengadukan, campuran diekstraksi disaring menggunakan kertas saring *Whatman* nomor 1 untuk memisahkan cairan ekstrak dari residu padat simplisia. Proses ekstraksi ini dilakukan secara berulang hingga filtrat yang diperoleh memiliki kejernihan yang optimal dan tidak lagi menunjukkan warna, menandakan bahwa senyawa aktif dalam simplisia telah terekstraksi secara maksimal ke dalam pelarut.

Selanjutnya, filtrat yang terkumpul mengalami proses penguapan dan pemekatan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Alat ini berfungsi untuk menghilangkan pelarut etanol secara efisien dengan bantuan tekanan vakum dan suhu yang dikontrol, sehingga senyawa aktif yang larut dapat terkonsentrasi menjadi ekstrak kental tanpa mengalami degradasi akibat panas berlebih. Proses pemekatan ini sangat penting untuk memperoleh ekstrak dengan konsentrasi senyawa bioaktif yang tinggi dan stabil.

Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian dikemas dalam wadah tertutup rapat untuk mencegah kontaminasi dan oksidasi yang dapat menurunkan kualitas ekstrak. Untuk menjaga kestabilan dan aktivitas senyawa aktif, ekstrak disimpan dalam lemari pendingin pada suhu yang terkontrol. Penyimpanan pada suhu rendah ini bertujuan untuk memperlambat proses degradasi kimia dan mikrobiologis, sehingga ekstrak dapat bertahan lebih lama dan tetap memiliki potensi bioaktif yang optimal saat digunakan untuk analisis lebih lanjut atau aplikasi produk.

Ekstraksi kencur (*Kempferia galanga* Linn) dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Proses ini melibatkan perbandingan antara simplisia dan pelarut dengan rasio 500 gram terhadap 500 mL. Serbuk simplisia kencur seberat 1000 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan direndam

dalam 500 mL etanol 96% selama tiga hari. Setelah itu, ampasnya dimaserasi ulang dengan 500 mL etanol 96% selama dua hari. Selama proses maserasi, ekstrak diaduk setiap enam jam sekali. Filtrat yang diperoleh disaring menggunakan corong Buchner, lalu diuapkan menggunakan rotary evaporator vakum pada suhu 50-60°C. Selanjutnya, ekstrak dipanaskan dengan water bath hingga menghasilkan ekstrak kental.

Rendemen dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{Bobot Simplisia}}{\text{Kering Bobot Ekstrak}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.1)$$

Proses ekstraksi ini diterapkan pada simplisia kencur yang dikeringkan dengan tiga metode berbeda, yaitu pengeringan langsung di bawah sinar matahari, pengeringan dengan *freeze dry*, dan pengeringan menggunakan oven. Tujuan ekstraksi adalah untuk menentukan metode pengeringan yang paling optimal dalam menghasilkan aktivitas antioksidan terbaik.

3.8 Skrining Fitokimia

1. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan memasukkan sejumlah ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas. Larutan tersebut didinginkan dan dikocok kuat selama 10 detik. Hasil positif untuk keberadaan saponin ditandai dengan terbentuknya buih setinggi minimal 1 cm yang mampu bertahan selama 10 menit atau lebih. Untuk memastikan kestabilan buih tersebut, ditambahkan 1 tetes asam klorida (HCl) 2 N. Jika buih tetap stabil dan tidak menghilang meskipun telah ditambahkan HCl, hal ini menunjukkan bahwa buih yang terbentuk memang berasal dari saponin. Stabilitas busa terhadap asam ini menegaskan bahwa senyawa saponin memiliki kemampuan membentuk busa yang tahan terhadap perubahan pH, yang merupakan ciri khas dari senyawa glikosida tersebut.

2. Uji Flavonoid

Dalam uji flavonoid, sejumlah ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol 95% di dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan serbuk magnesium dan asam klorida pekat. Penambahan serbuk magnesium

bersama HCl pekat berfungsi untuk mereduksi ikatan glikosida yang mengikat flavonoid, sehingga flavonoid bebas dapat terdeteksi. Proses reduksi ini penting karena flavonoid dalam bentuk glikosida tidak memberikan reaksi warna yang jelas. Hasil positif uji ini ditandai dengan munculnya warna kuning pada larutan, yang merupakan indikasi keberadaan flavonoid bebas dalam ekstrak.

3. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan memasukkan sejumlah ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam klorida (HCl) 2 N untuk menarik alkaloid dari simplisia ke dalam larutan. Alkaloid yang bersifat basa akan bereaksi dengan HCl membentuk garam alkaloid yang larut dalam air. Campuran larutan ini kemudian dipanaskan untuk memecah ikatan alkaloid yang tidak berbentuk garam, dan setelah itu didinginkan. Untuk mendeteksi keberadaan alkaloid, dilakukan reaksi pengendapan menggunakan tiga pereaksi khusus, yaitu Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih atau kuning, Wagner menghasilkan endapan berwarna coklat, dan Dragendorff menghasilkan endapan jingga. Munculnya endapan pada salah satu atau beberapa pereaksi tersebut menunjukkan hasil positif adanya alkaloid dalam ekstrak.

4. Uji Tanin

Uji tanin dimulai dengan memasukkan sejumlah ekstrak ke dalam tabung reaksi dan mencampurnya dengan 10 mL air panas, kemudian dipanaskan selama 5 menit untuk melarutkan senyawa tanin yang bersifat fenolik dan larut dalam pelarut polar. Setelah proses pemanasan, filtrat yang diperoleh dicampur dengan 3-4 tetes ferri klorida (FeCl_3). Reaksi antara tanin dan FeCl_3 menghasilkan perubahan warna yang khas, yaitu hijau kehitaman atau biru kehitaman, yang menandakan keberadaan gugus fenol dalam ekstrak. Uji ini efektif untuk mengidentifikasi tanin karena senyawa ini memiliki afinitas tinggi terhadap ion besi yang terdapat dalam ferri klorida.

5. Uji Steroid dan Triterpenoid

Pada uji ini, sejumlah ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil dan dikocok dengan sedikit eter untuk mengekstrak senyawa non-polar seperti steroid dan triterpenoid. Lapisan eter yang mengandung senyawa target kemudian diambil dan diteteskan pada plat tetes, lalu dibiarkan mengering. Setelah kering, pada sisa lapisan tersebut ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat secara berturut-turut. Terjadinya perubahan warna menjadi merah atau kuning menunjukkan hasil positif untuk keberadaan triterpenoid, sedangkan perubahan warna menjadi hijau menandakan keberadaan steroid. Warna-warna ini merupakan indikator visual yang khas dan sering digunakan dalam skrining awal untuk mengidentifikasi kelompok senyawa tersebut.

3.9 Parameter Standarisasi Simplisia

1. Parameter Non Spesifik

a. Kadar Air

Menurut Badan Standardisasi Nasional (2015), analisis kadar air dilakukan dengan metode penguapan menggunakan oven. Langkah pertama adalah mengeringkan cawan porselen pada suhu 105 °C selama 1 jam. Setelah itu, cawan ditempatkan dalam desikator selama 15 menit hingga dingin, kemudian ditimbang. Selanjutnya, timbang sampel sebanyak 3 gram dimasukkan ke dalam cawan dan dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 6 jam. Setelah 6 jam, cawan dimasukkan kembali ke dalam desikator hingga dingin. Proses ini diulangi sebanyak 3 kali hingga beratnya konstan. Kadar air kemudian dihitung menggunakan rumus yang telah ditentukan sebagai berikut:

$$\text{Kadar Air \%} = \frac{W_1 - W_0}{\text{Berat Sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.2)$$

Keterangan:

W1 = Wadah dengan isi sampel

W0 = Wadah tanpa isi sampel

b. Kadar Abu

Kadar abu merupakan parameter penting dalam analisis bahan pangan yang menunjukkan jumlah mineral atau zat anorganik yang terkandung dalam sampel tersebut. Mineral-mineral ini tidak dapat terbakar dan akan meninggalkan residu berupa abu setelah proses pembakaran sempurna. Oleh karena itu, kadar abu sering digunakan sebagai indikator kandungan mineral dalam bahan pangan, yang memiliki peranan penting dalam menentukan nilai gizi serta kualitas bahan tersebut. Prosedur penentuan kadar abu dimulai dengan pengambilan sampel sebanyak 2 gram. Sampel ini kemudian ditempatkan dalam cawan porselen yang sebelumnya telah dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama satu jam. Proses pengeringan ini bertujuan untuk menghilangkan kandungan air dan kelembapan yang masih melekat pada cawan, sehingga berat cawan dapat diketahui secara pasti dan stabil sebelum digunakan untuk penimbangan sampel. Setelah pengeringan, cawan didinginkan dalam desikator selama 15 menit agar tidak terpengaruh oleh kelembapan udara sekitar saat proses penimbangan berlangsung.

Setelah cawan dan sampel siap, penimbangan awal dilakukan menggunakan timbangan analitik dengan tingkat ketelitian tinggi. Sampel berikut cawan kemudian dimasukkan ke dalam tanur listrik untuk proses pembakaran. Pembakaran dilakukan pada suhu yang sangat tinggi, yaitu sekitar 600°C , selama dua jam atau hingga tidak ada lagi asap yang keluar dari cawan. Proses ini memastikan bahwa seluruh bahan organik dalam sampel terbakar habis, meninggalkan residu mineral yang stabil dan tidak mudah menguap.

Setelah proses pembakaran selesai, cawan yang berisi abu didinginkan kembali dalam desikator selama 30 menit. Pendinginan ini penting untuk menghindari penyerapan kelembapan dari udara yang dapat mempengaruhi hasil penimbangan. Setelah suhu cawan stabil, dilakukan penimbangan akhir menggunakan timbangan analitik. Berat abu yang diperoleh dari proses ini menjadi dasar untuk menghitung kadar abu dalam sampel.

Perhitungan kadar abu dilakukan dengan menggunakan rumus yang mengacu pada perbandingan berat abu terhadap berat awal sampel sebelum pembakaran. Hasil pengukuran kadar abu ini memberikan informasi kuantitatif mengenai total mineral yang terkandung dalam bahan pangan. Informasi ini sangat berguna dalam berbagai bidang, mulai dari ilmu gizi,

teknologi pangan, hingga pengendalian mutu produk makanan.

Kadar abu dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Abu \%} = \frac{W_1 - W_0}{\text{Berat Sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.3)$$

Keterangan:

W1 = Wadah dengan isi sampel

W0 = Wadah tanpa isi sampel

c. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Dalam perlakuan ini, abu yang diperoleh dididihkan dengan 25 ml asam klorida encer (HCl) selama 5 menit. Bagian yang tidak larut kemudian dikumpulkan dan disaring menggunakan kertas saring bebas abu, lalu dicuci dengan air panas. Kertas saring beserta isinya ditempatkan kembali dalam cawan, diuapkan di atas penangas air, dan kemudian dipanaskan dalam tanur pada suhu 525°C selama 3 jam. Setelah itu, didinginkan dalam desikator selama 30 menit. Kadar abu tidak larut asam dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{KATLASam(\%)} = \frac{\text{berat abu yang tidak larut asam}}{\text{berat abu awal}} \times 100\% \dots\dots(3.4)$$

2. Parameter Spesifik

a. Kadar Sari Larut Air

Untuk menentukan kadar sari larut air, diperlukan 5 gram simplisia yang dimaserasi dalam labu Erlenmeyer selama 24 jam dengan 100 ml air-kloroform (2,5 ml kloroform dalam 100 ml aquadest). Campuran diaduk setiap 6 jam pertama dan didiamkan selama 18 jam. Setelah itu, disaring dan 20 ml filtrat diuapkan di atas penangas air hingga kering dalam cawan penguap yang sudah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga beratnya tetap. Kadar sari yang larut dalam air dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{KSLAir \%} = \frac{\text{berat sari larut air}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \dots\dots\dots(3.5)$$

b. Kadar Sari Larut Etanol

Untuk menentukan kadar sari larut etanol, diperlukan 5 gram simplisia yang dimaserasi dalam labu Erlenmeyer dengan 100 ml pelarut etanol

96%. Campuran dikocok selama 6 jam pertama, lalu didiamkan selama 18 jam. Setelah itu, sampel disaring dengan cepat menggunakan kertas saring untuk menghindari penguapan etanol. Sebanyak 20 ml filtrat kemudian diuapkan di atas penangas air hingga kering dalam cawan penguap yang sudah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga beratnya tetap. Kadar senyawa yang larut dalam etanol 95% dihitung terhadap berat ekstrak awal. Kadar sari yang larut dalam etanol dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{KSLEtanol \%} = \frac{\text{berat sari larut etanol}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \dots\dots\dots (3.6)$$

3.10 Pengujian Aktivitas Antioksidan Kencur (*Kaempferia galanga* Linn)

Pengujian aktivitas antioksidan pada kencur (*Kaempferia galanga* Linn) akan dilakukan setelah proses ekstraksi, dilakukan uji aktivitas antioksidan pada masing-masing sampel untuk mengevaluasi metode pengeringan kencur yang menghasilkan aktivitas antioksidan optimal. Uji ini menggunakan metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) dengan langkah-langkah berikut:

1. Persiapan Larutan Stok DPPH
 Sebanyak 2,5 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL metanol p.a, dihomogenkan, kemudian dilapisi aluminium foil untuk melindungi larutan dari cahaya. Larutan stok DPPH ini memiliki konsentrasi 500 ppm.
2. Pembuatan Larutan Blanko
 Larutan stok DPPH (500 ppm) sebanyak 2 mL dicampur dengan 2 mL metanol p.a, dihomogenkan, dan diinkubasi selama 30 menit.
3. Penentuan Panjang Gelombang Optimum
 Sebanyak 4 mL larutan dipindahkan ke kuvet, lalu spektrum serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dalam rentang panjang gelombang 400-800 nm untuk menentukan panjang gelombang optimal.
4. Pengukuran Serapan Absorbansi
 Larutan DPPH sebanyak 2 mL dicampur dengan 2 mL metanol p.a dalam botol coklat, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian diukur

absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 670 nm. Pengukuran dilakukan tiga kali sebagai replikasi.

5. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Sebanyak 2,5 mg asam askorbat dilarutkan dalam 50 mL metanol p.a untuk membuat larutan stok. Larutan ini diencerkan menjadi konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Setiap larutan uji sebanyak 2 mL dicampur dengan 2 mL larutan DPPH, dihomogenkan, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 670 nm.

6. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Kencur (500 ppm)

Sebanyak 25 mg ekstrak kencur kental dari masing-masing metode pengeringan dilarutkan dalam etanol hingga mencapai volume 50 mL. Larutan stok ini diencerkan menjadi konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, dan 125 ppm. Setiap larutan dipindahkan ke labu volumetrik 10 mL dan ditambahkan metanol p.a hingga mencapai volume.

7. Pengukuran Aktivitas Antioksidan DPPH pada Sampel

Sebanyak 2 mL larutan ekstrak pada masing-masing konsentrasi dicampur dengan 2 mL larutan DPPH, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, lalu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 670 nm. Proses ini dilakukan dengan tiga replikasi.

8. Penentuan Nilai IC₅₀

Persentase inhibisi dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.7)$$

Hasil persentase inhibisi dari berbagai konsentrasi sampel kemudian diplotkan pada sumbu x (konsentrasi) dan y (persen inhibisi) menggunakan persamaan regresi linear $y = a \pm bx$. Dari persamaan ini, nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas DPPH, dihitung. Nilai IC₅₀ menunjukkan kemampuan antioksidan suatu ekstrak, di mana semakin kecil nilai IC₅₀, semakin tinggi aktivitas antioksidan dari sampel tersebut.

3.11 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan metode statistik analisis varians dua arah atau *two-way ANOVA*. Metode ini dipilih untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antara berbagai perlakuan yang diterapkan, serta untuk menguji adanya interaksi antara ketiga perlakuan tersebut. Pengujian dilakukan pada tingkat signifikansi $\alpha=0,05$, yang berarti bahwa hasil dianggap signifikan apabila probabilitas kesalahan kurang dari 5 persen. Pendekatan ini memungkinkan peneliti untuk tidak hanya menilai efek utama dari masing-masing faktor perlakuan secara terpisah, tetapi juga untuk memahami bagaimana interaksi antar faktor tersebut mempengaruhi variabel respons yang diamati.

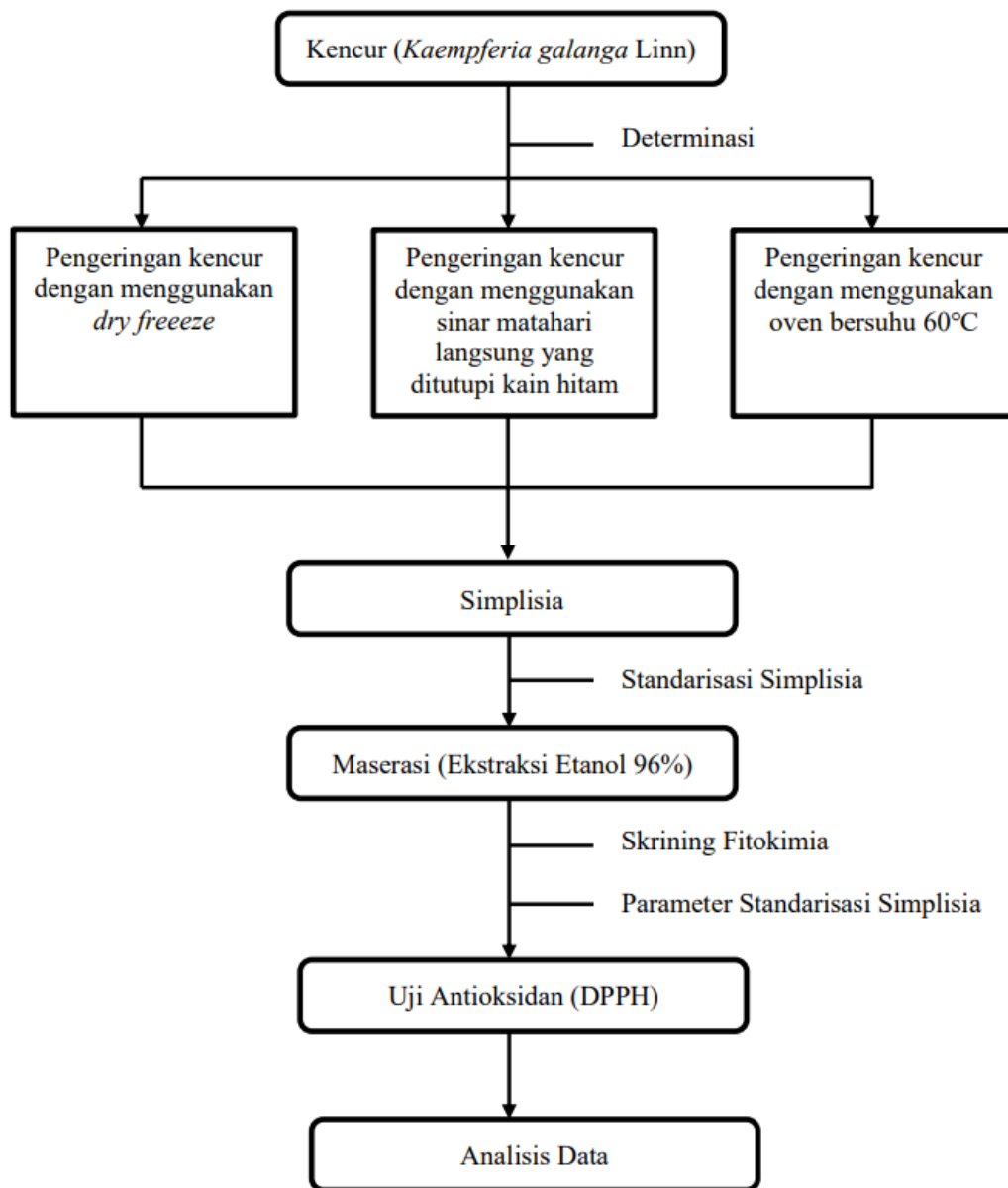
Analisis varians dua arah sangat berguna dalam penelitian yang melibatkan lebih dari satu faktor karena dapat memberikan gambaran yang komprehensif mengenai pengaruh kombinasi faktor terhadap hasil penelitian. Dengan menggunakan *two-way ANOVA*, peneliti dapat menentukan apakah perbedaan yang muncul pada data disebabkan oleh perlakuan utama, interaksi antar perlakuan, atau hanya merupakan variasi acak. Hal ini sangat penting agar kesimpulan yang diambil bersifat valid dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

Setelah analisis varians dua arah dilakukan dan ditemukan adanya perbedaan yang signifikan, langkah selanjutnya adalah melakukan analisis lanjutan berupa segmentasi satu arah atau *one-way ANOVA* pada setiap faktor secara terpisah. Segmentasi ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara lebih rinci perlakuan mana yang memberikan pengaruh berbeda secara nyata terhadap variabel yang diukur. Dengan demikian, peneliti dapat memperoleh pemahaman yang lebih mendalam mengenai kontribusi masing-masing faktor serta interaksi yang terjadi.

Penerapan analisis varians ini juga membantu dalam mengurangi risiko kesalahan tipe I (*false positive*) yang dapat terjadi jika hanya dilakukan perbandingan sederhana tanpa mempertimbangkan interaksi antar faktor. Selain itu, penggunaan *ANOVA* memberikan keunggulan dalam mengolah data yang memiliki banyak kelompok perlakuan, sehingga analisis menjadi lebih efisien dan informatif.

3.12 Diagram Alir

Berikut merupakan diagram alir penelitian yang disajikan pada Gambar dibawah ini:



Gambar 3. 12 Diagram Alir Penelitian