

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen laboratorium, dengan rancangan untuk mengetahui nilai aktivitas antioksidan rimpang jahe merah dengan menggunakan metode *Diphenyl-picrylhydrazyl-radical* (DPPH) dan mengetahui pengaruh ekstrak rimpang jahe merah terhadap aktivitas antihemolisis pada sel darah merah (Nazir, 2005).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan perlakuan yang dapat dikontrol di laboratorium agar tidak ada pengaruh variabel lain yang tidak diinginkan (Nazir, 2005). Perlakuan dalam penelitian adalah pemberian berbagai konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah *Zingiber officinale var. Rubrum*. Proses ekstraksi menggunakan etanol sebagai pelarut. Ekstrak pelarut etanol dari rimpang jahe merah yang digunakan adalah konsentrasi 80, 100, 120, 140 dan 160 ppm digunakan untuk identifikasi aktivitas antioksidan dan aktivitas antihemolisis (Susanti, 2015). Sementara itu kontrol positif yang digunakan adalah larutan yang berisi vitamin c berupa asam askorbat.

Tanaman jahe merah yang digunakan dari rentang umur 7-9 bulan. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer dan metode DPPH, kemudian setiap konsentrasi ekstrak akan diuji coba antihemolisis untuk melihat adanya indikator radikal bebas pada sel darah manusia. Sel darah diambil dari wanita yang berumur 20-25 tahun dengan berat 50-57 kg (Kamilah, 2011). Sel darah dibuat larutan stok dengan menggunakan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) kemudian diambil sebanyak 500 µl, kemudian darah diberi zat oksidan berupa H₂O₂ (Hidrogen peroksida) sebanyak 1 ml lalu dilihat nilai absorbansinya untuk mengetahui nilai antihemolisisnya.

Menurut Gomez (1995) penentuan banyaknya pengulangan masing-masing konsentrasi berdasarkan perhitungan rumus:

$$(t)(r) - 1 \geq 21$$

Keterangan:

t : perlakuan

r : pengulangan

21 : faktor nilai derajat kebebasan umum

Berdasarkan rumus diatas jika jumlah perlakuan (t) = 5, maka jumlah pengulangan yang dilakukan adalah minimal 4 kali pengulangan pada setiap konsentrasi.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah ekstrak rimpang jahe merah yang telah dibuat berbagai macam konsentrasi dan sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah yang diberi indikator stress peroksida (H₂O₂) dan kemudian diberi ekstrak jahe merah pada berbagai konsentrasi. Darah didapatkan dari darah manusia berumur 20-25 tahun dengan berat badan 50-57 kg.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian mulai dilaksanakan dari bulan Maret 2017 hingga Juni 2017 di Laboratorium Riset Bioteknologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 229 Bandung dan Laboratorium Farmasi Jurusan Farmasi Universitas Islam Bandung, Jalan Taman Sari Bandung Wetan

E. Prosedur Kerja

1. Tahap Persiapan

a. Pengumpulan Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*)

Rimpang jahe merah yang berumur 7-9 bulan diperoleh dari Balai Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO) kemudian dicuci dan dibersihkan dengan air mengalir. Setelah bersih, dilakukan pengeringan yang dilakukan di bawah sinar matahari selama 10 menit lalu rimpang jahe merah ditimbang sebanyak 2,5 kg lalu

dipotong kecil-kecil hingga 2 mm. Pengeringan dilanjutkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 3 hari, dan diblender hingga menjadi serbuk dengan ukuran 50 mesh.

b. Sterilisasi

Tahap ini meliputi persiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Alat-alat yang terbuat dari bahan kaca dan plastik dibersihkan, kemudian semua alat yang akan digunakan disterilisasi.

2. Tahap Pra-penelitian

a. Proses Ekstraksi

Metode ekstraksi menggunakan metode Stoilova, (2007) dengan modifikasi. Sampel sebanyak 25 mg direndam di dalam pelarut etanol 70%, pemakaian pelarut dalam satu kali sebanyak 250 ml. Perendaman dilakukan sambil dilakukan pengocokan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 40°C selama 150 menit agar larutan homogen, kemudian larutan dibiarkan selama 18 jam pada suhu ruangan agar pemisahan filtrat maksimal. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas whatmann no. 1 untuk memisahkan filtrat dan ampasnya. Residu yang diperoleh diekstraksi kembali dengan etanol sehingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat dipekatkan dengan vacuum *rotary evaporator* suhu 60°C sehingga didapatkan ekstrak kental yang masih bisa dituang, kemudian sisa pelarut diuapkan di oven dengan suhu tidak lebih dari 60°C sampai mendapatkan ekstrak kental etanol jahe merah kemudian ditimbang untuk pengujian fenol, aktivitas antioksidan dan antihemolisis. Rendemen (ekstrak kental) rimpang jahe merah dihitung menggunakan rumus (Umam, 2009).

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Jumlah ekstrak yang dihasilkan (gr)}}{\text{Jumlah bahan sebelum diolah (gr)}} \times 100\%$$

b. Penentuan Konsentrasi

Penentuan konsentrasi jahe merah dimodifikasi dari penelitian yang dilakukan Susanti (2015) yang menggunakan dosis 50 ppm hingga 200 ppm untuk melihat pengaruh nilai antioksidan pada jahe (*Zingiber officinale*). Sehingga, untuk mencari

nilai dari aktivitas antioksidan rimpang jahe merah digunakan konsentrasi 80, 100, 120, 140 dan 160 ppm. Pembuatan konsentrasi dari ekstrak etanol rimpang jahe merah terlampir pada Lampiran 2.

3. Tahap Penelitian

a. Determinasi Kandungan Fenol Total

Penetapan kandungan fenol total ini dilakukan berdasarkan metode Singleton dan Rossi (1975). Ekstrak yang telah dilarutkan kembali dengan etanol absolut diambil sebanyak 500 µl dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 500 µl reagen folin ciocalteu yang telah diencerkan 10 kali, reagen folin ciocalteu berfungsi sebagai pengoksidasi gugus fenolik hidroksil (Viranda, 2009). Setelah campuran dibiarkan 2 menit kemudian ditambahkan 2 ml larutan natrium karbonat 7,5% (Na₂CO₃). Segera ditambahkan aquades hingga mencapai 10 ml. Larutan diinkubasi pada suhu ruangan selama 60 menit, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 765nm.

Sebagai kontrol, dibuat larutan asam galat dengan konsentrasi 1000 ppm dalam etanol absolut. Kemudian larutan stok diencerkan untuk mendapatkan larutan kerja kadar 10 ppm. Selanjutnya dibuat serangkaian larutan standar dengan kadar 0; 80; 100; 120; 140 dan 160 ppm. Pembuatan larutan standar dibuat secara duplo. Hasil dari kandungan total fenol digambarkan dengan satuan mg/GAE (Yuhernita, 2006).

$$TPC = \frac{C.V.fp}{g}$$

Keterangan:

- C = Konsentrasi Fenolik (µg/ml)
- V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)
- fp = Faktor pengenceran
- g = Berat sampel yang digunakan (g)

b. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rimpang Jahe Merah

Masing-masing konsentrasi dari ekstrak rimpang jahe merah diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode Suniati (2012) dengan modifikasi. Hal yang pertama dilakukan adalah membuat larutan DPPH 0,1 mM. Selanjutnya, nilai IC₅₀ dihitung dengan menggunakan rumus persamaan regresi. Pada tahap awal tiap

Ratih Ajeng Miarsih, 2017

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIHEMOLISIS EKSTRAK RIMPANG JAHE MERAH (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

konsentrasi ekstrak yang sudah dilarutkan dengan etanol absolut diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 ml DPPH dan diinkubasi pada suhu ruangan dan tertutup matahari selama 1 menit, dan sebagai pembanding dibuat larutan antioksidan sintesis berupa vitamin C (asam askorbat) yang dibuat masing-masing konsentrasi 80,100,120, 140 dan 160 ppm yang dilarutkan ke dalam etanol p.a Larutan yang telah dibuat ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517nm.

Larutan blanko yang digunakan adalah 1 ml etanol p.a dimasukkan kedalam tabung reaksi .Larutan diinkubasi pada suhu ruangan dan tertutup matahari selama 1 menit. Larutan tanpa sampel berupa 2 ml DPPH dan diinkubasi pada suhu ruangan juga diukur nilai absorbansinya untuk mengetahui nilai aktivitas antioksidan pada sampel. Penentuan nilai inhibisi ditentukan dengan menggunakan rumus berikut (Mukherjee, 2014).

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

Keterangan :

Absorbansi sampel : Absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan sampel

Absorbansi kontrol : Absorbansi DPPH tanpa sampel

Hasil dari nilai inhibisi digunakan untuk nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi senyawa antioksidan yang dibutuhkan untuk mengurangi radikal DPPH sebesar 50%. Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak atau sebagai sumbu x dan % penangkapan radikal sebagai sumbu y. Makin kecil nilai IC_{50} maka semakin aktif ekstrak atau fraksi uji tersebut sebagai senyawa penangkap radikal DPPH atau senyawa antioksidan. Nilai IC_{50} ekstrak rimpang jahe merah akan dibandingkan dengan nilai IC_{50} pembanding rutin.

c. Uji Antihemolisis Sel Darah Merah

1. Isolasi Sel Eritrosit

Eritrosit diisolasi dari darah perifer donor. Darah donor diambil secara aseptis oleh seorang perawat di Poliklinik Universitas Pendidikan Indonesia. Darah kemudian dipindahkan ke dalam tabung antikoagulan steril yang berisi EDTA agar darah tidak menggumpal. Kemudian darah dipindahkan dalam tabung mikrotube sebanyak 1,5 ml untuk dipisahkan fasa plasma dan *buffy coat*.

Pemisahan eritrosit awal dilakukan dengan sentrifuge pada kecepatan 1500 x g selama 20 menit pada suhu 4°C, agar dapat melihat pada perbedaan fasa darah dan akan terlihat ada 3 lapisan di dalam tabung. Lapisan yang paling atas berwarna kuning adalah plasma darah, lapisan *buffy coat* terdiri dari leukosit dan platelet yang berada di tengah. Lapisan plasma yang berada di bagian atas dan *buffy coat* kemudian dibuang.

Sel eritrosit kemudian dicuci menggunakan larutan PBS (*Phosphat Buffer Saline*). Sel eritrosit dicuci dengan 5 ml PBS pH 7,4 lalu disentrifuge kembali dengan kecepatan 1500 x g selama 20 menit. Eritrosit akan mengendap di dasar tabung dan larutan PBS akan berwarna kemerahan, lalu larutan PBS dibuang dan sel eritrosit disuspensikan kembali dalam 4x volume PBS.

2. Pengaruh ekstrak rimpang jahe merah terhadap hemolisis eritrosit

Disiapkan sel eritrosit stok sebanyak 20 ml. Suspensi sel sebanyak 500 µl dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan ekstrak yang telah dilarutkan dengan DMSO 5% sebanyak 1 ml lalu diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C, dan ditambah 1 ml 10 mM H₂O₂ sebagai pemicu stress peroksidatif. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 150, setelah diinkubasi masing-masing sampel ditambah IPB (*Isotonic Phosphat Buffer*) dengan lima macam konsentrasi dan masing-masing empat kali pengulangan. Disiapkan juga kontrol negatif, yaitu 500 µl eritrosit ditambah dengan 1 ml 10 mM H₂O₂.

3. Perhitungan persentase hemolisis

Nilai absorbansi yang diperoleh dari pengukuran kemudian digunakan untuk menghitung nilai persentase hemolisis eritrosit. Rumus perhitungan persentase hemolisis eritrosit adalah sebagai berikut (Umam, 2009) :

$$\% \text{ hemolisis eritrosit} = \left(1 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol negatif}}\right) \times 100\%$$

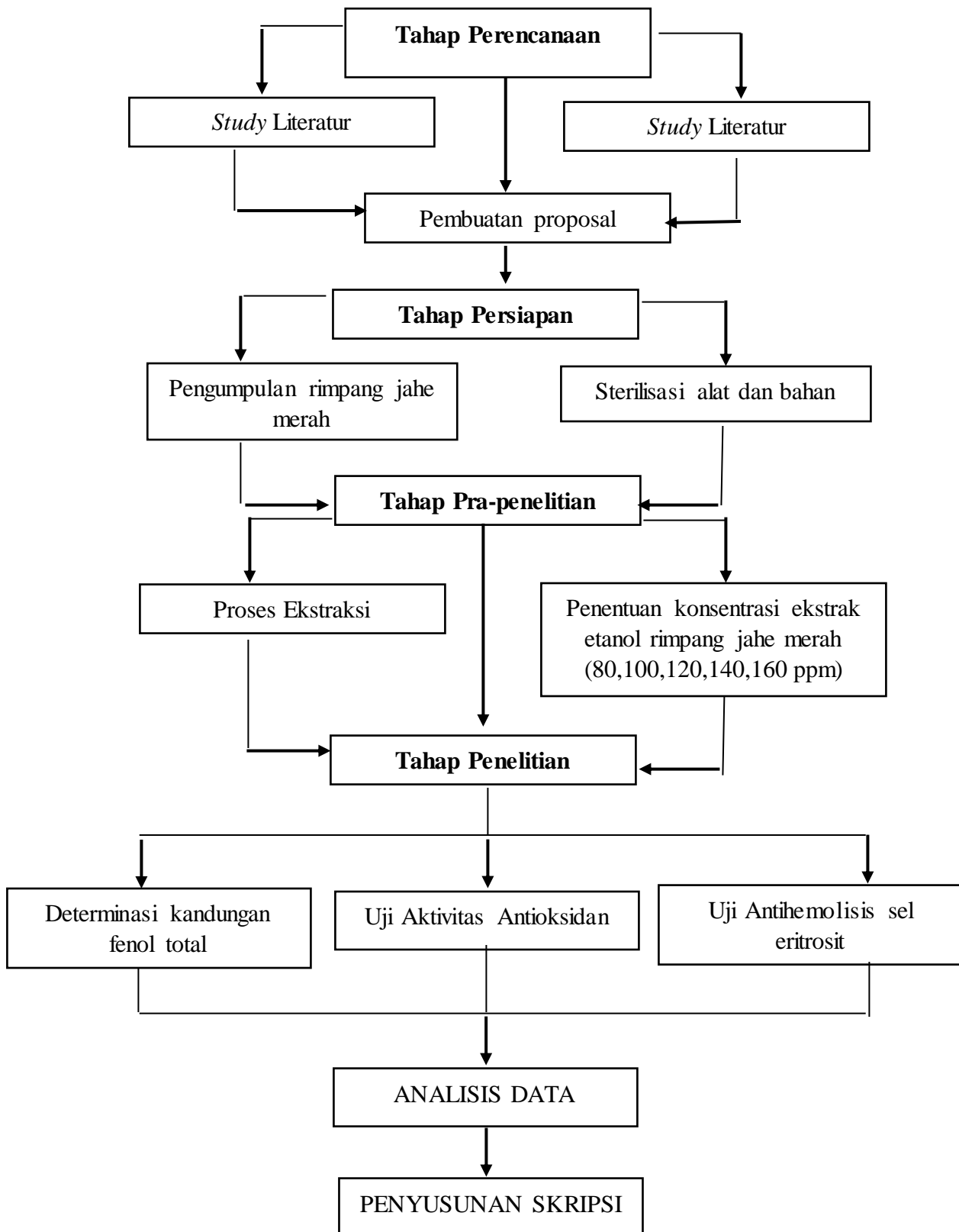
F. Analisis Statistik

Semua perhitungan dianalisis statistika menggunakan program SPSS 16 *for windows*. Tahap awal yang dilakukan adalah uji prasyarat yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov* dan uji homogenitas menggunakan *test of homogeneity of variance*. Data yang terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistik parametrik yaitu *Analysis of Variance* (ANOVA). Data yang tidak homogen dan tidak normal diuji secara statistik non parametrik yaitu dengan uji *Kruskal-Wallis*. Data yang signifikan dianalisis menggunakan uji lanjut *post hoc tuckey*. Data yang tidak berbeda signifikan tidak diuji lebih lanjut dengan uji perbandingan berganda. Uji Korelasi antar variabel menggunakan *Anova one way* dan uji korelasi *pearson*. Data yang didapat berguna untuk mendeterminasi apakah terdapat pengaruh ekstrak jahe merah terhadap aktivitas radikal bebas dan antihemolisis.

G. Alur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi 3 tahapan, yaitu tahap persiapan berupa pengumpulan rimpang jahe merah dan sterilisasi alat, tahap pra-penelitian berupa proses ekstraksi dan penentuan konsentrasi pelarut, tahap penelitian yang meliputi determinasi kandungan total fenol, uji aktivitas antioksidan dan uji antihemolisis. Diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1

F. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian