

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian kuantitatif. Penelitian ini dilakukan dengan pengolahan statistik, dan percobaan yang diujikan pada objek. Jenis pendekatan yang digunakan adalah eksperimental laboratorium yaitu penelitian yang dilakukan di laboratorium untuk mengetahui pengaruh pemberian suatu *treatment* atau perlakuan terhadap subjek penelitian (Sugiyono, 2011). Objek penelitian yang digunakan adalah ekstrak rimpang temulawak sebagai antioksidan dan antihemolisis.

B. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah manusia sehat berusia 20-25 tahun dengan berat badan 50-60 kg.

C. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap merupakan rancangan dengan beberapa perlakuan yang disusun secara random untuk seluruh unit percobaan. Desain ini digunakan karena percobaan yang dilakukan di laboratorium dan kondisi lingkungan dapat dikontrol (Nazir, 2003).

Perlakuan dalam penelitian ini adalah pengukuran kandungan total fenol, aktivitas antioksidan menggunakan DPPH dan aktivitas antihemolisis. Pada pengukuran kandungan total fenol menggunakan konsentrasi ekstrak rimpang temulawak 1000 ppm (20 mg ekstrak dan 20 ml etanol 95%) dan membuat seri konsentrasi dari larutan asam galat yaitu 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm untuk dibuat kurva asam galat.

Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan DPPH dilakukan pada berbagai konsentrasi ekstrak rimpang temulawak dan perbandingan asam askorbat. Konsentrasi yang digunakan adalah 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Larutan stok pada ekstrak rimpang temulawak maupun perbandingan asam askorbat dibuat dengan konsentrasi 500 ppm atau 10 mg berat ekstrak/asam askorbat dalam 20 ml pelarut etanol 95%. Larutan stok konsentrasi 500 ppm selanjutnya dibuat seri konsentrasi yang akan digunakan dengan melakukan pengenceran dengan penambahan pelarut

etanol 95%. Sebagai bentuk radikal digunakan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,1 mM dengan penambahan pelarut etanol 95%.

Selanjutnya pada pengukuran aktivitas antihemolisis menggunakan sel darah merah (eritrosit) dengan stress oksidatif berupa hidrogen peroksida. Pada ekstrak rimpang temulawak dan asam askorbat dibuat larutan stok dengan konsentrasi 500 ppm atau 10 mg berat ekstrak/asam askorbat dalam 20 ml larutan DMSO 5%. Larutan stok konsentrasi 500 ppm dibuat pada berbagai konsentrasi yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm dengan melakukan pengenceran menggunakan pelarut DMSO 5%. Sebagai stress oksidatif digunakan hidrogen peroksida 30% pada konsentrasi 10 mM (Sundaram *et al.*, 2011) dengan penambahan pelarut akuades.

Menurut Gomez & Gomez (1995), penentuan banyaknya pengulangan pada masing-masing konsentrasi akan digunakan pada pengukuran aktivitas antioksidan dan antihemolisis. Perhitungan menggunakan rumus: $(t) (r) - 1 \geq 21$. Pada penelitian ini digunakan lima konsentrasi yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm, sehingga jumlah pengulangan (r) yang dilakukan sebanyak empat kali pada setiap konsentrasi.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Juni 2017 di Laboratorium Ekologi dan Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Poliklinik Universitas Pendidikan Indonesia serta Laboratorium F Penelitian Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Bandung.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap yaitu tahap persiapan (persiapan alat dan bahan yang akan digunakan serta pemilihan rimpang temulawak), tahap penelitian (pembuatan serbuk rimpang temulawak, pembuatan ekstrak rimpang temulawak, penentuan kandungan total fenol, uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH, uji aktivitas antihemolisis), dan tahap analisis data.

1. Tahap persiapan

Tahap ini meliputi persiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian dan pemilihan rimpang temulawak yang digunakan. Peralatan yang digunakan seperti yang berbahan kaca, aluminium dicuci dengan bersih. Untuk alat-alat yang tersambung dengan listrik seperti oven, *rotary evaporator*, *shaker*, spektrofotometer UV Vis, *laminar air flow*, dan sentrifuge dipastikan dapat digunakan dengan baik dan dalam keadaan tidak rusak.

Bahan utama yang digunakan adalah rimpang temulawak. Rimpang temulawak yang dipakai adalah galur Roxb. dengan usia 7 - 9 bulan. Pada rentang umur tersebut mempunyai aktivitas antioksidan yang paling besar (Rosiyani, 2010). Rimpang temulawak diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko Lembang. Bahan lainnya dalam penelitian ini pun harus disiapkan seperti bahan-bahan kimia yang digunakan dalam pengujian kandungan total fenol, aktivitas antioksidan, dan aktivitas antihemolisis.

2. Tahap Penelitian

a. Pembuatan Serbuk Rimpang Temulawak

Langkah pembuatan ekstrak diawali dengan proses pembuatan serbuk rimpang temulawak. Sebanyak 2,5 kg rimpang temulawak 7-9 bulan dikupas kulitnya kemudian dicuci hingga bersih. Rimpang temulawak dirajang menjadi potongan-potongan kecil dengan ketebalan kurang lebih 1-2 mm. Irisan rimpang dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50-60°C selama kurang lebih tiga hari hingga teksturnya sedikit mengkerut dan berubah warna menjadi kuning kecoklatan (Gambar 3.1.).



Gambar 3.1. Rimpang temulawak setelah dioven
(Dokumentasi Pribadi, 2017)

Selanjutnya rimpang digiling hingga menjadi serbuk. Serbuk diayak menggunakan saringan berukuran 100 mesh lalu ditimbang dan dimasukkan ke dalam plastik untuk siap digunakan (Gambar 3.2.).

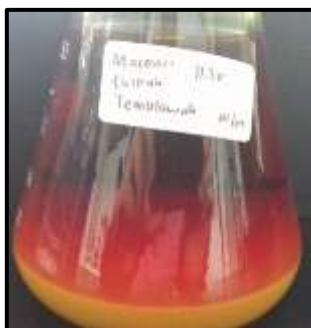


Gambar 3.2. Serbuk Rimpang Temulawak
(Dokumentasi Pribadi, 2017)

b. Pembuatan Ekstraksi Rimpang Temulawak

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi yaitu metode ekstraksi dengan cara merendam sampel menggunakan pelarut. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol. Serbuk temulawak dan etanol

95% (p.a) yang digunakan adalah perbandingan 1 : 10. Sebanyak 10 gram serbuk rimpang temulawak dilarutkan dalam 100 ml etanol 95% dalam labu Erlenmeyer. Larutan dihomogenkan menggunakan shaker dengan kecepatan 200 rpm selama 2 jam. Selanjutnya proses maserasi dilakukan selama 24 jam (satu hari) (Gambar 3.3.). Larutan lalu disaring menggunakan kertas Whatmann No 1 sampai ekstrak terpisah dari ampas. Hasil ekstraksi diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50-55 °C selama 2-3 jam hingga menjadi pasta. Pasta dipindahkan ke dalam botol vial lalu ditimbang dan selanjutnya disimpan pada lemari es dengan suhu 4 °C..



Gambar 3.3. Proses Maserasi Rimpang Temulawak Selama 24 jam (Dokumentasi Pribadi, 2017)

c. Penentuan Kadar Total Fenol

Kadar total fenol dihitung menggunakan metode Folin Ciocalteu berdasarkan penelitian dari Rajeshwari *et.al.* (2013) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 0,5 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi (ukuran 5 ml) lalu dicampurkan dengan 2,5 ml dari 10 kali pengenceran reagen Folin Ciocalteu dan ditambahkan 2 ml dari 7,5% larutan sodium karbonat (Na_2CO_3). Tabung kemudian ditutup menggunakan parafilm. Inkubasikan pada suhu kamar selama 30 menit di ruangan gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 760 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kandungan total fenol dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut.

$$C = c \times V / m$$

dimana **C** adalah kadar total fenol (mgGAE/100g sampel), **c** adalah kadar ekuivalen asam galat (mg/ml), **V** merupakan volume larutan (ml), dan **m** adalah berat ekstrak (gram).

d. Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan DPPH (2,2'-diphenyl-1-picryl hydrazyl)

Aktivitas antioksidan dari ekstrak rimpang temulawak ditentukan dari aktivitas DPPH dalam menangkap radikal bebas dengan metode yang dijelaskan oleh Nahak *et al.* (2011) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 0,5 ml sampel dimasukkan dalam tabung reaksi lalu dicampurkan dengan 3 ml larutan DPPH 0,1 M (yang dilarutkan dengan etanol 95%). Inkubasikan di ruangan gelap pada suhu 25 °C selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kemampuan DPPH dalam menangkap radikal bebas dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ penghambatan} = \{[A_0 - A] / A_0\} \times 100$$

dimana A_0 adalah nilai absorbansi DPPH tanpa sampel pada panjang gelombang 517 nm. Sedangkan A adalah nilai absorbansi DPPH dengan sampel.

e. Uji Aktivitas Antihemolisis

Aktivitas antihemolisis didasarkan pada metode yang digunakan oleh Shanthy *et al.* (2011) dengan beberapa modifikasi. Hemolisis pada eritrosit dilihat dari keberadaan H_2O_2 (Hidrogen peroksida) sebagai radikal bebas dalam darah.

Sampel darah manusia diambil dari perempuan sehat berusia 20-25 tahun sebanyak 20 ml. Pengambilan darah dilakukan di Poliklinik UPI. Proses pengambilan darah menggunakan suntikan steril (ukuran 5 ml) dan dimasukkan ke dalam tabung berisi antikoagulan EDTA (*Ethylene diamine tetraacetic acid*).

Pemisahan eritrosit dari sampel darah yang telah diambil dilakukan di Laboratorium Penelitian F Prodi Farmasi UNISBA. Pemisahan eritrosit darah manusia dilakukan dengan metode yang digunakan oleh Shanthy *et al.* (2011) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 1 ml darah dari tabung antikoagulan EDTA (*Ethylene diamine tetraacetic acid*) dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* berukuran 1,5 ml. Sentrifugasi sampel pada kecepatan 1000xg pada suhu 4 °C selama 20 menit. Hasilnya akan terbentuk

33

Ningtyas Arum Sari, 2018

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIHEMOLISIS EKSTRAK RIMPANG TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

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

3 fase yaitu plasma darah, leukosit, dan eritrosit (fase paling bawah). Bagian plasma darah dan leukosit dibuang hingga yang tersisa hanya bagian eritrositnya. Eritrosit kemudian dicuci dengan larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4 dengan volume yang sesuai dengan volume eritrosit yang didapatkan dalam tabung. Selanjutnya disentrifugasi kembali pada kecepatan 1000xg pada suhu 4 °C selama 20 menit. Buang fase selain eritrosit lalu eritrosit disuspensikan dalam 4x volume PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Gambar 3.4.).



Gambar 3.4. Suspensi Eritrosit Manusia
(Dokumentasi Pribadi, 2017)

Uji penghambatan hemolisis pada eritrosit manusia dalam penelitian ini berdasarkan metode yang dilakukan oleh Rafat *et al.* (2009) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 500 μl suspensi eritrosit dalam IPB (*Isotonic Phosphate Buffer*) dengan pH 7,4 ditambahkan dengan 1 ml ekstrak rimpang temulawak. Larutan kemudian dicampurkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 180 menit. Selanjutnya untuk memicu stress oksidatif, ditambahkan 1 ml dari 10 mm H_2O_2 (Hidrogen peroksida) lalu diinkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 150 menit. Setelah diinkubasi, tambahkan larutan IPB sampai dengan volume 9 ml. Hemoglobin yang terlepas dalam supernatan kemudian dihitung menggunakan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang 540 nm. Sebagai kontrol negatif dibuat campuran eritrosit yang hanya diberi stress oksidatif H_2O_2 sebagai nilai hemolisis sempurna tanpa diberikan larutan

ekstrak temulawak maupun asam askorbat. Untuk pembandingan asam askorbat dilakukan tahapan yang sama dengan ekstrak rimpang temulawak. Analisis hasil uji antihemolisis dengan menggunakan perhitungan sebagai berikut.

$$\% \text{ Penghambatan hemolisis} = [1 - A_{\text{antioksidan}} / A_{\text{H}_2\text{O}_2}] \times 100$$

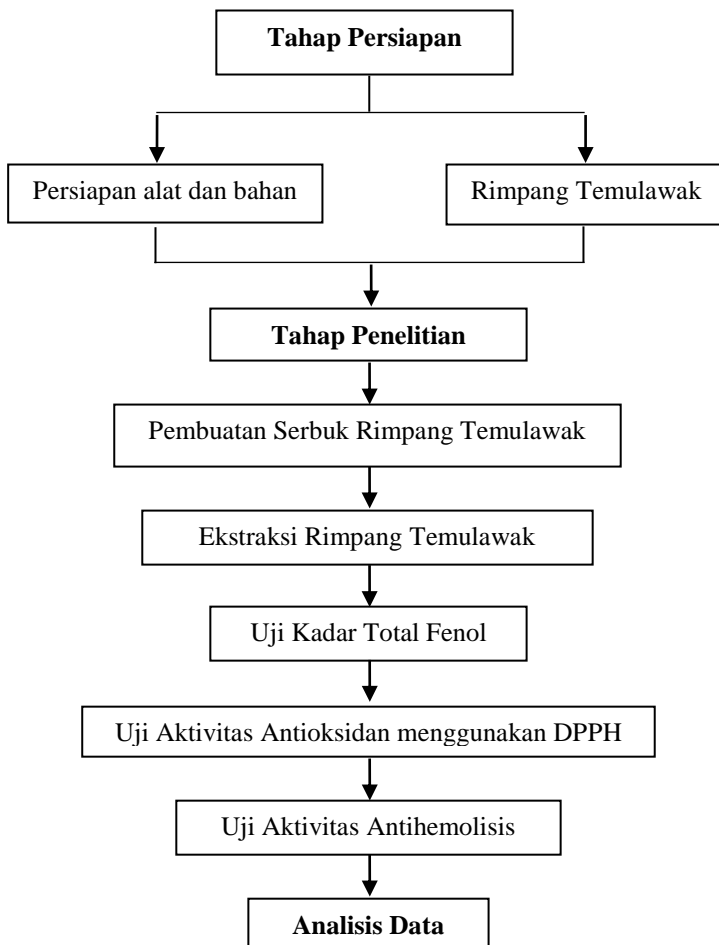
dimana $A_{\text{antioksidan}}$ merupakan nilai absorbansi sampel yang mengandung ekstrak dan pembandingan asam askorbat sedangkan $A_{\text{H}_2\text{O}_2}$ merupakan nilai absorbansi sampel yang tidak mengandung ekstrak dan pembandingan asam askorbat (kontrol negatif).

F. Analisis Data

Data hasil pengukuran aktivitas antioksidan dan aktivitas antihemolisis diolah menggunakan analisis statistik. Pengolahan data dilakukan menggunakan Microsoft Excel dan SPSS 21. Analisis regresi linier pada pengukuran aktivitas antioksidan dan antihemolisis diolah menggunakan Microsoft Excel 2010. Analisis regresi linier bertujuan untuk mendapatkan nilai persamaan untuk menentukan nilai IC_{50} dan EC_{50} . Selanjutnya data dianalisis menggunakan SPSS 21. Data nilai inhibisi dari setiap konsentrasi dan nilai IC_{50} dan EC_{50} dilakukan uji homogenitas dan normalitas menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Jika data terdistribusi normal dan homogen maka pengolahan data dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Pada analisis hubungan konsentrasi kandungan total fenol terhadap nilai inhibisi aktivitas antioksidan dan antihemolisis menggunakan analisis Korelasi Pearson.

G. Alur Penelitian

Berikut merupakan bagan alur penelitian dimulai dari tahap persiapan alat dan bahan yang digunakan kemudian dilanjutkan dengan tahapan penelitian melalui tahapan proses sampai dengan analisis data dan kesimpulan.



Gambar 3.5. Bagan Alur Penelitian