

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental yang dilakukan dengan meneliti aktivitas antioksidan dari sampel temulawak *whitening cream* dengan metode DPPH.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2020 sampai Juni 2020 di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Sains, Teknologi dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta.

C. Alat dan Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain temulawak *whitening cream*, metanol pa, DPPH (*Aldrich*), aquades dan vitamin C (*Merck*)

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain :erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, labu ukur, beker gelas, mikro pipet, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 105*), kuvet, dan timbangan analitik (*ACIS*)

D. Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah poin-poin yang akan menjadi karakteristik suatu penelitian. Dalam penelitian ini ada 2 jenis variabel yaitu:

1. Variabel Independen

Variabel independen yang juga sering disebut sebagai variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat). Adapun variabel bebas pada penelitian ini adalah persen (%) aktivitas antioksidan atau nilai IC₅₀ pada pengujian aktivitas antioksidan.

2. Variabel Dependen

Variabel Dependen (terikat) merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat adanya variabel bebas. Adapun variabel terikat pada penelitian ini adalah konsentrasi temulawak *whitening cream* dan vitamin C sebagai pembanding.

E. Definisi Operasional

Definisi Operasional yaitu definisi yang membatasi ruang lingkup atau variabel-variabel yang diteliti.

1. Konsentrasi krim

Konsentrasi krim adalah konsentrasi yang diukur dengan spektrofotometri uv-vis untuk mendapatkan absorbansi yang digunakan dalam persamaan regresi linear untuk menghasilkan nilai IC₅₀.

2. Inhibitory Concentration 50 (% IC₅₀)

Inhibitory Concentration 50 (% IC₅₀) adalah nilai konsentrasi temulawak *whitening cream* yang memberikan % aktivitas antioksidan sebesar 50% (merendam 50% aktivitas dari DPPH) dibanding kontrol melalui

persamaan garis regresi linear antara kadar terhadap persen penangkap radikal (Yuslianti, 2018).

F. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Larutan Stok Sampel

Ditimbang 3,0 gram krim temulawak, dilarutkan dalam methanol hingga 25,0 mL.

2. Pembuatan Larutan DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Larutan DPPH konsentrasi 0,4 mM dibuat dengan cara ditimbang 0,0157 gram DPPH dalam botol gelap, kemudian dilarutkan dalam 100,0 mL metanol dan dikocok sampai homogen, diletakkan pada suhu rendah, ditutup dengan aluminium foil dan segera digunakan (Murwanto dan Santoso, 2012).

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH konsentrasi 0,4 mM ditentukan absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 400-600 nm. Berdasarkan absorbansi tertinggi maka dapat ditentukan panjang gelombang maksimum dari larutan DPPH tersebut.

4. Penentuan *Operating Time* (OT)

Penentuan *operating time* larutan kontrol DPPH dilakukan dengan cara dipipet 1,0 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian ditambahkan dengan metanol hingga 5 mL. Setelah itu dihomogenkan

dan ditutup dengan aluminium foil kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH setiap 5 menit hingga 60 menit. *Operating time* ditentukan saat diperoleh absorbansi yang stabil yaitu tidak terlihat adanya penurunan absorbansi.

5. Pengujian peredaman radikal bebas dengan reaksi warna (analisa kualitatif)

Uji kualitatif bertujuan untuk mengetahui kemampuan larutan uji dalam meredam DPPH. Bila larutan uji dapat memudarkan warna DPPH maka larutan tersebut mempunyai potensi dalam meredam DPPH sehingga dapat dilakukan uji kuantitatif. Larutan sampel diambil 2,0 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi bersih dan kering. Ditambahkan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1,0 mL. Diamati perubahan warna yang terjadi, apabila warna cepat memudar maka larutan uji sampel berpotensi meredam DPPH dan dapat dilakukan uji kuantitatif. Sebagai kontrol digunakan methanol 2,0 mL dan larutan DPPH 4 mM sebanyak 1,0 mL (Ramadani, 2013).

6. Pembuatan Larutan Uji

Dibuat larutan stok krim temulawak konsentrasi 120.000 ppm, dengan cara ditimbang 3 gram krim temulawak dilarutkan dengan methanol pada labu ukur 25 mL hingga didapatkan konsentrasi temulawak 120.000 ppm. Kemudian larutan stok krim dibuat 5 seri konsentrasi 240, 480, 720, 960 dan 1200 ppm.

7. Pembuatan larutan Pembanding (Vitamin C)

Larutan standar asam askorbat dengan konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 25 mg vitamin C kedalam labu takar 25,0 mL dengan aquades. Kemudian larutan diencerkan menjadi 5 seri konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm dan 8 ppm.

8. Uji Aktivitas Antioksidan.

a. Pengukuran Absorbansi Larutan Uji Temulawak *Whitening Cream*

Pengukuran absorbansi larutan uji Temulawak *Whitening Cream*; 240 ppm, 480 ppm, 720 ppm, 960 ppm dan 1200 ppm. Larutan konsentrasi dibuat dengan cara dipipet 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L dan 50 μ L dari larutan induk, masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambah dengan 1,0 mL larutan DPPH dan ditambahkan metanol hingga 5 mL. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dan ditutup alumunium foil. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dalam ruang gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum pada spektrofotometer *UV-Vis*. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan tiga kali pengulangan (triplo).

b. Pengukuran Absorbansi Larutan Pembanding Vitamin C

Larutan pembanding vitamin C konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm dan 8 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur, kemudian ditambahkan dengan 1,0 mL larutan DPPH dan

metanol hingga 5.0 mL, larutan dihomogenkan dan ditutup dengan aluminium foil. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dalam ruang gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum 515 nm pada spektrofotometer *UV-Vis*. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan tiga kali pengulangan (*triplo*).

G. Analisa Data Antioksidan

Perhitungan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH menurut Sreenivasan et al., (2007) diukur dari peredaman warna ungu merah dari DPPH dihitung dengan rumus:

$$(\%) \text{ Perendaman} = \frac{(A \text{ Kontrol} - A \text{ sampel})}{A \text{ kontrol}} \times 100\%$$

Dari harga % peredaman pada berbagai konsentrasi, dibuat kurva konsentrasi larutan uji vs % peredaman, kemudian dihitung regresinya dan ditentukan harga IC_{50} (Yuslianti, 2018). Senyawa dengan kemampuan antioksidan sangat kuat apabila memiliki nilai $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$, antioksidan kuat antara 50 – 100 $\mu\text{g/mL}$, antioksidan sedang dengan nilai IC_{50} antara 101-250 $\mu\text{g/mL}$, antioksidan lemah apabila nilai IC_{50} antara 250-500 $\mu\text{g/mL}$, antioksidan sangat lemah bila nilai $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ (Yuslianti, 2018), seperti yang terlihat dalam Tabel 3.1

Tabel 3.1 Klasifikasi antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀

Nilai IC ₅₀	Antioksidan
<50 ppm	Sangat kuat
50 - 100 ppm	Kuat
101 - 250 ppm	Sedang
250 - 500 ppm	Lemah
>500 ppm	Sangat Lemah