

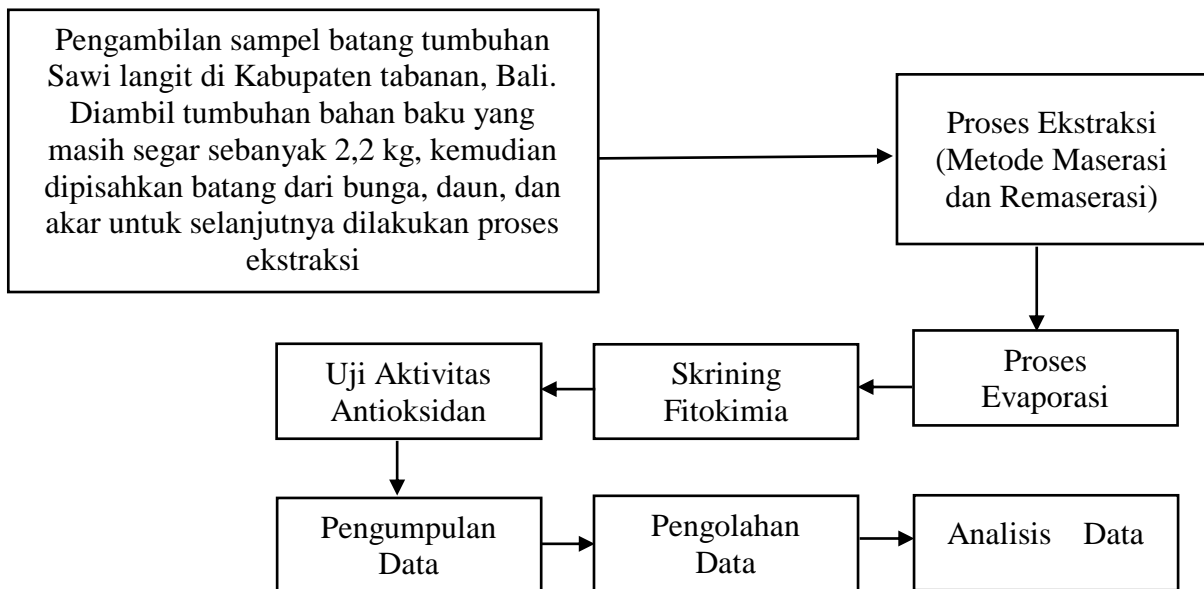
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksperimen sederhana. Menurut Sugiyono (2015) eksperimen sederhana adalah metode penelitian yang digunakan untuk menentukan efek dari satu perlakuan tertentu terhadap perlakuan lainnya dalam kondisi yang terkendalikan. Studi eksperimen sederhana dalam penelitian yang akan dilakukan yaitu skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak batang tumbuhan Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less.).

B. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel dari batang tumbuhan Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less.) di Kabupaten Tabanan, Bali. Sedangkan untuk pemeriksaan skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Kimia Terapan dan Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember tahun 2022 hingga April tahun 2023

D. Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini yaitu ekstrak batang tumbuhan Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less.)

2. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak dengan mempergunakan etanol 70% dari batang tumbuhan Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less.) yang diperoleh di Kabupaten Tabanan, Bali. Kriteria inklusi dari batang Sawi langit dan menggunakan sampel dari cabang dan induk batang yang berwarna hijau segar, tidak berlubang, berukuran 30 cm. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu, batang yang layu dan berwarna coklat. Dengan demikian, sampel yang memenuhi kriteria inklusi akan digunakan dalam penelitian ini.



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 5. Sampel yang Memenuhi Kriteria Inklusi

3. Jumlah dan besar sampel penelitian

Volume yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 2,2 kg sampel bahan baku segar dari batang tumbuhan Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less).

4. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini menggunakan metode pengamatan secara langsung dengan menganalisis secara kualitatif pada uji skrining fitokimia dan menganalisis kuantitatif uji aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol batang tumbuhan Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less).

a. Alat

Adapun peralatan yang digunakan dalam penelitian, yaitu : Beaker glass, Gelas ukur 10 ml (Pyrex); Erlenmeyer 250 ml, dan 500 ml (Pyrex); cawan petri, kertas saring, corong, pipet volume 1 ml dan 5 ml (Pyrex), botol kaca 500 ml, karet

penghisap, batang pengaduk, timbangan atau neraca analitik (Kern), tabung reaksi (Pyrex) dan rak tabung, hot plate dan pipet tetes, seperangkat alat Spektrofotometer UV-Vis (SPECORD 210 plus), kuvet, aluminium foil, blender, alat evaporator.

b. Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian, yaitu : Batang dari tumbuhan Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less) (2200 gr), aquadest steril (5000 ml), metanol (5 ml), reagen dragendorff (1 ml), wagner (1 ml), etanol 70% (10.000 ml), amonia 25% (1 ml) , asam klorida pekat (1 ml), asam sulfat pekat (2 ml), FeCl₃5% (1 ml), asam klorida 2N (1 ml), serbuk DPPH (0,004 gr).

c. Cara Penentuan Sampel

1) Pengambilan bahan

Batang sawi langit yang diambil di Kabupaten Tabanan, Bali adalah batang yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau segar, tidak berlubang, berukuran 30 cm.

2) Pembuatan serbuk simplisia

Batang sawi langit yang telah diperoleh, kemudian ditimbang dan disortasi dengan memisahkan batang tumbuhan Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less.) dari bunga, daun, dan akar. Dibersihkan, cuci dengan air mengalir, kemudian ditiriskan, di cacah dan ditimbang berat batang yang masih segar, lalu di oven dengan suhu < 50°C. Kemudian batang sawi langit, kembali disortasi untuk memisahkan dari bahan-bahan yang ikut tercampur dalam proses pengeringan, selanjutnya diserbukan dengan cara di blender atau ditumbuk dan ditimbang berat keringnya.

3) Ekstraksi

Sampel tanaman dikeringkan dan digiling. Serbuk simplisia sebanyak 435 gr dari batang sawi langit lalu diekstraksi melalui proses maserasi dan remaserasi, kemudian direndam dengan 3500 ml etanol 70% lalu ditutup dan dibiarkan selama 2 hari. Setelah 2 hari, saring etanol dan tamping pada botol kaca kemudian ampas batang sawi langit ditambahkan 3500 ml etanol 70% lalu ditutup dan biarkan selama 3 hari. Kemudian, etanol dan ampas dari sawi langit tersebut kembali disaring, dengan perlakuan yang sama, rendam kembali menggunakan larutan 2150 ml etanol 70%, kemudian simpan selama 2 hari. Setelah disimpan selama 2 hari maserat dituang dan disaring (Handoyo, 2020). Maserasi dan reamaserasi yang dihasilkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45-60°C hingga menghasilkan ekstrak kental.

Ekstrak kental tersebut ditimbang dan dihitung rendemen ekstrak kentalnya. Dengan rumus sebagai berikut (Badaring, dkk., 2020) :

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100 \%$$

Rendemen ekstrak merupakan hasil perbandingan dari jumlah metabolit yang diperoleh setelah proses ekstraksi dan berat sampel yang digunakan. Rendemen ekstrak dikatakan baik apabila nilainya tidak kurang dari 12,2%. Oleh karena itu rendemen ekstrak yang didapatkan dinyatakan baik, apabila hasil rendemen >12,2% menurut Farmakope Herbal Indonesia (FHI) (Depkes RI, 2017). Semakin tinggi nilai rendemen menunjukkan bahwa ekstrak yang dihasilkan semakin baik digunakan dan termasuk dalam nilai standar (Badaring, dkk., 2020).

Pelarut etanol 70% digunakan karena etanol 70% adalah pelarut polar, dapat mengekstraksi atau memisahkan berbagai macam senyawa polar dari yang polar

hingga yang non polar. Semakin tinggi konsentrasi etanol, semakin kurang tingkat polar pelarutnya. Jika pelarut yang digunakan memiliki kepolaran yang sama, maka larutan tersebut dapat menarik dan melarutkan zat (Surya & Luhurningtyas, 2021).

d. Prosedur Kerja

Identifikasi skrining fitokimia yang dilakukan meliputi *flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin, tanin*. Uji skrining fitokimia dalam penelitian ini menurut metode Harborne (1996) sebagai berikut :

1) Preparasi Sampel dan Uji Skrining Fitokimia

Ditimbang 10 gr ekstrak kental batang Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less). Kemudian dilarutkan dalam 250 ml etanol 70% , lalu aduk dan saring. Filtrat dari batang Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less.) siap untuk dilakukan uji skrining fitokimia.

a) Pembuatan Blanko

Untuk fitokimia dari flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin, tanin akan sama prosedurnya dengan pengujian sampel. Hanya pada saat penambahan sampel diganti dengan metanol.

b) Pengujian Flavonoid

Dipipet 1 ml sampel filtrat batang Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less.). Kemudian ditambahkan 1 ml ammonia solution 25% dan 1 ml H₂SO₄ pekat. Diamati perubahan warna jika positif maka akan berubah menjadi warna kuning.

c) Pengujian Alkaloid

Bagi ke dalam 2 buah tabung. Tabung I : Dipipet 1 ml sampel filtrat batang Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less.), tambahkan 1 ml reagen Dragendorff dan tambahkan 3 tetes HCl 2N, dilihat reaksi jika positif maka akan berubah menjadi

warna merah jingga. Tabung II: Dipipet 1 ml sampel filtrat batang Sawi langit (*Vernonia cinerea* (L.) Less.), tambahkan 1 ml reagen Wagner, kemudian tambahkan 3 tetes HCl 2N, dilihat reaksi jika positif maka akan berubah menjadi warna merah jingga.

d) Pengujian Terpenoid

Dipipet 1 ml sampel, ditambahkan 1 ml H₂SO₄ pekat (asam sulfat pekat). Lalu diamati reaksinya apabila terjadi perubahan warna hijau kekuningan.

e) Pengujian Saponin

Dipipet 1 ml sampel, ditambahkan 10 ml air hangat, didinginkan, kemudian dikocok 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin.

f) Pengujian Tanin

Dipipet 1 ml sampel, ditambahkan 1 ml FeCl₃ 5%. Kemudian diamati reaksinya apabila terjadi perubahan warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya Tanin.

2) Uji Aktivitas Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan dengan metode *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil* (DPPH). Membuat larutan DPPH dengan serbuk DPPH ditimbang sebanyak 0,004 gr dan 100 ml metanol, lalu dihomogenkan, bungkus dengan aluminium foil, dan inkubasi selama 30 menit (Sedjati, dkk., 2017). Setelah itu, membuat konsentrasi sampel dengan berbagai varian yaitu 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, dan 125 ppm. Variasi konsentrasi ini dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Saridewi, dkk., 2017).

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan :

V1 : Jumlah volume larutan encer yang ingin dibuat

M1 : Konsentrasi volume pekat yang akan diencerkan

V2 : Jumlah volume yang akan diambil dari larutan pekat

M2 : Konsentrasi volume larutan encer yang ingin dibuat

Pada tahap selanjutnya, mengisi tabung reaksi dengan masing-masing reaksi sebanyak 3 ml, kemudian menambahkan 1 ml larutan DPPH lalu menutup tabung reaksi dengan aluminium foil agar tidak terkontaminasi dengan udara luar, kemudian diinkubasi pada suhu ruang yaitu 27°C selama 30 menit (Patria & Soegihardjo, 2013). Ditentukan panjang gelombang maks yaitu λ 517 nm, DPPH menunjukkan absorbansi kuat yaitu dengan warna ungu tua pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Sebelum memasukan sampel, dibuat blanko dari metanol sebanyak 4 ml. Setelah itu, sampel dari masing-masing konsentrasi secara bergantian dimasukkan ke dalam kuvet diukur absorbansi pada spektrofotometri UV-Vis. Data absorbansi yang diperoleh dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya (Jackie & Destiani, 2017).

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang digunakan pada penelitian adalah data primer (Sugiyono, 2015). Data dalam penelitian ini adalah :

- a. Data primer merupakan data yang diperoleh dengan pengamatan langsung yang dilakukan oleh peneliti (Sugiyono, 2015). Data primer diperoleh dari eksperimen di laboratorium. Data yang diperoleh berupa data dari hasil uji kualitatif pada skrining fitokimia dan kuantitatif pada uji aktivitas antioksidan pada ekstrak batang tumbuhan sawi langit.

2. Cara pengumpulan data

Pada cara pengumpulan data jenis ini dilakukan melalui observasi. Observasi adalah teknik pengumpulan data yang dilakukan melalui proses yang merekam suatu keadaan atau perilaku subjek secara langsung (Sugiyono, 2015).

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh kemudian disatukan dan diolah melalui cara analisis kualitatif yaitu menjelaskan *flavonoid*, *alkaloid*, *terpenoid*, *saponin*, dan *tannin*. Data aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dihitung dengan menggunakan persamaan berikut (Rahmayan, dkk., 2013) :

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

Tabel 2
Kriteria dari Nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration*)

No.	Kriteria	Nilai IC ₅₀	Satuan
1.	Sangat Kuat	< 50	ppm
2.	Kuat	50-100	ppm
3.	Sedang	100-250	ppm
4.	Lemah	250-500	ppm
5.	Tidak Aktif	>500	ppm

Sumber : Putri & Hidajati (2015)

Nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration*) 50% menentukan nilai IC₅₀ diperoleh garis 50% daya hambat dengan sumbu konsentrasi, dengan persamaan (Rahmayan, dkk., 2013) : $y = ax + b$ dimana $y = 50$ dan x adalah konsentrasi larutan uji yang mampu menghambat 50% larutan radikal bebas.

Sebagai contoh, apabila persamaan $y = 5,2140x + 3,0215$, maka :

$$y = 5,2140x + 3,0215$$

$$50 = 5,2140x + 3,0215$$

$$x = \frac{50 - 3,0215}{5,2140} = 9,0$$

Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan hasil nilai $x = 9,0$ atau nilai IC₅₀ = 9,0 ppm.

Perhitungan nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*) digunakan untuk mengetahui index aktivitas antioksidan dengan rumus berikut (Alfira, 2014) :

$$\text{Nilai AAI} = \frac{\text{Konsentrasi DPPH (ppm)}}{\text{IC}_{50} \text{ sampel (ppm)}}$$

Tabel 3
Kriteria dari Nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*)

No.	Kriteria	Nilai AAI	Satuan
1.	Sangat Kuat	> 2,0	ppm
2.	Kuat	1,0-2,0	ppm
3.	Sedang	0,5-1,0	ppm
4.	Lemah	< 0,5	ppm

Sumber : Vasic, et al., (2012)

Diketahui konsentrasi DPPH adalah 40 ppm, maka :

$$\begin{aligned} \text{Nilai AAI} &= \frac{40 \text{ ppm}}{9,0 \text{ ppm}} \\ &= 4,4 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Artinya aktivitas antioksidan sampel tersebut dengan nilai 4,4 ppm termasuk dalam kriteria AAI yaitu Sangat Kuat.

2. Analisis Data

Setelah diketahui hasil nilai pengamatan pada uji skrining fitokimia, uji aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} akan dianalisis secara deskriptif kuantitatif.