

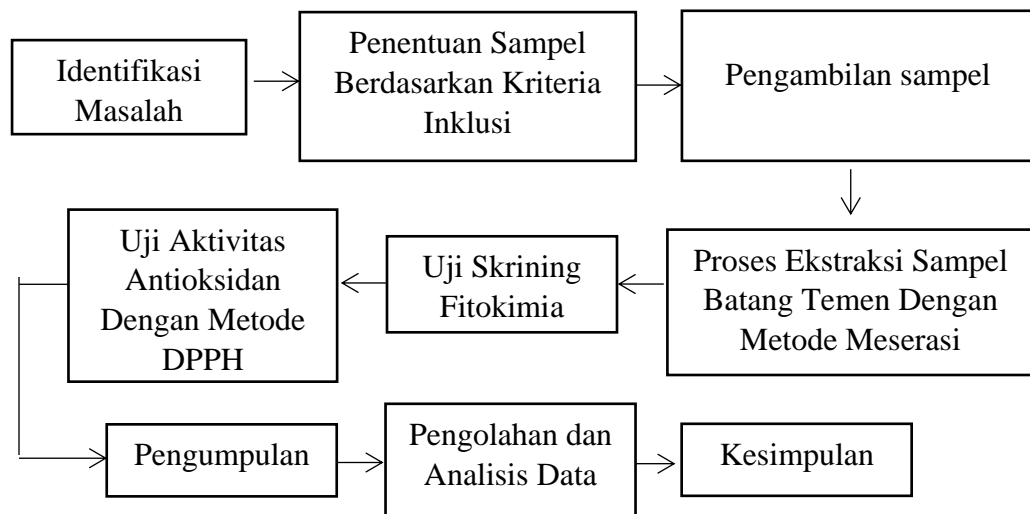
BAB IV

METODELOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif merupakan dilakukan dengan cara mencari informasi berkaitan dengan gejala yang ada, dijelaskan dengan jelas tujuan yang akan diraih, merencanakan bagaimana melakukan pendekatannya, dan mengumpulkan berbagai macam data sebagai bahan untuk membuat laporan (Jayusman dkk., 2020).

B. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat yang digunakan untuk penelitian adalah Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemensos Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dilakukan pada bulan November tahun 2022 sampai April tahun 2023.

D. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% batang temen (*Graptophyllum pictum* L. Griff) yang diperoleh dari Banjar Celuk, Desa Celuk.

2. Kriteria sampel

Kriteria sampel batang temen yang digunakan adalah batang temen (*Graptophyllum pictum* L. Griff) yang berwarna ungu dengan panjang 40 cm dari pucuk batang, dan tidak terdapat hama yang menempel disekeliling batang.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Adapun jenis data yang dikumpulkan dalam pada penelitian ini adalah data primer yaitu meliputi kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol pada batang temen (*Graptophyllum pictum* L. Griff).

2. Teknik pengumpulan data

Metode pengumpulan data pada penelitian ini adalah dengan pengamatan langsung yaitu dengan cara menganalisis secara kualitatif kandungan fitokimia dan analisis kuantitatif uji aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol batang temen (*Graptophyllum pictum* L. Griff).

3. Alat dan bahan

- a. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari blender (getra), alat timbang (kern), saringan, toples, pipet tetes, tabung reaksi (iwaki), labu ukur (iwaki), *rotary evaporator* (buchi), spektrofotometer *UV-vis*.
- b. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang Temen (*Graptophyllum pictum* L. Griff), etanol 96%, asam sulfat, pereaksi dragendorff, pereaksi mayer wagner, air panas, serbuk magnesium, H₂SO₄, HCl dan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*).

4. Prosedur penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan yaitu:

- a. Pengambilan bahan penelitian

Batang temen (*Graptophyllum pictum* L. Griff) diambil dari Banjar Celuk, Desa Celuk batang berwarna yang segar ungu dengan panjang 40 cm dari pucuk, dan tidak terdapat hama yang menempel disekeliling batang.



Sumber: Dokumentasi Pribadi

Gambar 5. Sampel Batang Temen Dengan Panjang 40 cm

- b. Pembuatan serbuk simplisia

Batang temen (*Graptophyllum pictum* L. Griff) yang telah disortasi sesuai dengan kriteria inkulsi kemudian ditimbang selanjutnya batang temen dicuci

dengan air mengalir, dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering batang kembali disortasi untuk memisahkan dari bahan-bahan yang ikut tercampur dalam proses pengeringan, kemudian diserbukan dengan cara dihaluskan atau ditumbuk dan ditimbang berat batang yang sudah kering.

c. Proses ekstraksi

Sampel tanaman dikeringkan dan dihaluskan. Setelah itu diekstraksi dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:5 (Artini, 2021), dengan cara menimbang serbuk simplisia batang temen sebanyak 329 gr direndam dengan 2.000 ml etanol 96% lalu ditutup dan dibiarkan selama 2 hari. Setelah 2 hari saring etanol kemudian ampas batang temen ditambahkan 2.000 ml etanol 96% lalu ditutup dan biarkan selama 2 hari. Setelah 2 hari, etanol dan ampas batang temen kembali disaring, lakukan hal yang sama kemudian simpan selama 3 hari. Setelah disimpan selama 3 hari maserat dituang dan disaring. Hasil maserat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C, hingga dihasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut ditimbang dan dihitung rendemen ekstrak kentalnya (Depkes RI, 2000).

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

Rendemen adalah perbandingan berat kering produk yang dihasilkan dengan berat bahan baku (Yuniarifin., dkk 2006). Nurhayati dkk, (2009) menyatakan bahwa nilai rendemen yang tinggi menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung di dalamnya. Menurut Dewastisari (2018), nilai rendemen berkaitan dengan banyaknya kandungan bioaktif yang terkandung pada tumbuhan. Budiyanto (2015) menyatakan bahwa semakin tinggi rendemen ekstrak maka semakin tinggi kandungan zat yang tertarik ada pada suatu bahan baku.

Pelarut etanol digunakan karena memiliki sifat yang universal, polar dan mudah didapat. Etanol 96% dipilih karena selektif, tidak toksik, absorpsinya baik dan kemampuan penyariannya yang tinggi sehingga dapat menyari senyawa yang bersifat non-polar, semi polar, dan polar (Wendersteyt dkk., 2021).

d. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi uji *alkaloid, flavonoid, tannin saponin, dan steroid*.

1) Alkaloid

Uji *alkaloid* dilakukan dengan menambahkan sampel seblanylak 3 ml kemudian ditambahkan 3 tetes asam klorida 2 N. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 2 tabung tabung pertama ditambahkan dengan pereaksi Dragendroff, dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendrof, Mayer, dan Wagner. Terbentuknya endapan jingga hingga merah pada tabung pertama dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung kedua menunjukkan adanya *alkaloid* pada sampel tersebut (Hanani, 2014).

2) Flavonoid

Uji *flavonoid* dilakukan menggunakan satu tabung, memipet sebanyak 1 ml sampel kemudian ditambahkan dengan 0,1 gr mg (seujung spatula), lalu ditambahkan pereaksi HCl pekat sebanyak 10 tetes. Jika terbentuk warna jingga menunjukkan adanya *flavonoida* (Hanani, 2014).

3) Tanin

Uji *tanin* dilakukan menggunakan satu tabung dengan memipet sampel sebanyak 2 ml ditambahkan dengan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1 %. Jika

terjadi perubahan warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya *tanin* (Hanani, 2014).

4) *Saponin*

Uji *saponin* dilakukan menggunakan satu tabung dengan memipet sampel sebanyak 1 ml lalu ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 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* (Hanani, 2014).

5) *Steroid*

Uji *steroid* dan *titerpenoid* dilakukan dengan sejumlah 3 ml sampel ditambahkan H₂SO₄ pekat lalu dikocok. Jika terbentuk warna merah menunjukan hasil positif adanya *steroid* (Hanani, 2014).

e. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

1) Pembuatan larutan DPPH

Pembuatan larutan DPPH dilakukan dengan menimbang sebanyak 4 mg serbuk DPPH dilarutkan dengan menggunakan etanol sebanyak 100 ml.

2) Absorbansi kontrol

Pada tahapan absorbansi control dilakukan dengan mengambil 1 ml larutan DPPH dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan etanol sebanyak 3 ml setelah itu tabung reaksi dengan aluminium foil agar tidak terkontaminasi dengan udara luar, selanjutnya tabung reaksi di inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian tabung reaksi yang sudah di inkubasi tersebut dimasukkan kedalam kuvet dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *Uv-vis*.

3) Penentuan panjang gelombang

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui pada serapan berapa zat yang dibaca oleh spektrofotometer *UV-vis* secara optimum, bentuk kurva absorbansi yang linier dan menghasilkan hasil yang cukup konstan jika dilakukan berulang kali (Hanani, 2005). Penentuan panjang gelombang DPPH dilakukan dengan larutan diambil menggunakan pipet sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 5 ml larutan etanol dan dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap dan diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm (Prasetyo dkk., 2021).

4) Pembuatan larutan kontrol

Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan memipet sebanyak 1 ml larutan DPPH ditambahkan dengan 3 ml etanol, kocok hingga homogen dan diamkan selama 30 menit. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

5) Pembuatan larutan stok

Sebanyak 20 mg ekstrak etanol batang temen (*Graptophyllum pictum* L. Griff) dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 100 ml (konsentrasi 200 ppm). Dengan masing-masing konsentrasi 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, dan 25 µg/mL dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran, yaitu: $M_1.V_1 = M_2.V_2$ (Damanis dkk., 2020).

Keterangan:

V_1 = Volume awal larutan

M_1 = Konsentrasi awal larutan

V_2 = Volume akhir larutan

M_2 = Konsentrasi akhir

Pada kelima konsentrasi, masing-masing hasil yang didapatkan dari hasil V_1 dipipet dan ditambahkan etanol 96% hingga mencapai tanda batas (10 ml), kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan menggunakan aluminium foil untuk digunakan pada perlakuan selanjutnya (Damanis dkk., 2020). Contoh pembuatan konsentrasi larutan 100 $\mu\text{g/mL}$, dihitung dengan rumus:

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

$$200 \times V_1 = 100 \times 10$$

$$V_1 = 100 \times 10 : 200$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Jadi volume awal larutan yang akan diencerkan yaitu 5 mL, hasil dari perhitungan V_1 dipipet dan ditambahkan etanol 96% hingga mencapai tanda batas 10 mL pada labu ukur.

Tabel 2
Volume Larutan Awal Pada Beberapa Konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	V_1 (Volume Larutan Awal)
100	5 ml
75	3,75 ml
50	2,5 ml
25	1,25 ml

6) Uji aktivitas antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan dengan mengambil sebanyak 3 ml ekstrak etanol batang temen (*Graptophyllum pictum* L. Griff) dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$ ditambahkan masing-masing 1 mL larutan DPPH dalam etanol dan divorteks selama 5 detik. Berubahnya warna ungu menjadi warna kuning menunjukkan adanya efisiensi penangkal radikal bebas. Selanjutnya ukur absorbansi dengan

spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 517 nm, setelah diinkubasi selama 30 menit (Damanis dkk., 2020).

7) Perhitungan presentase inhibisi dan nilai IC₅₀

Perhitungan presentase inhibisi dilakukan dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Sedangkan perhitungan Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi dimana ekstrak dapat menangkap radikal bebas sebesar 50% yang diperoleh dengan memakai persamaan regresi linear $y = bx + a$. Grafik dibuat dengan konsentrasi sampel uji (ppm) sebagai absis (sumbu x) terhadap persen inhibisi sebagai ordinat (sumbu y) (Rumalgit dkk., 2015).

Tabel 3

Kriteria Nilai IC₅₀ (Inhibition Concentration 50)

Nilai IC ₅₀ (ppm)	Kategori
< 50	Sangat kuat
50-100	Kuat
100-250	Sedang
250-500	Lemah
>500	Tidak Aktif

Sumber: Vasic dkk (2012)

Tabel 4

Kriteria Nilai AAI (Antioxidant Activity Index)

Nilai AAI (ppm)	Kategori
>2,0	Sangat kuat
1,0-2,0	Kuat
0,5-1,0	Sedang
,0,5	Lemah

Sumber: Scherer dan Godoy (2009)

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Pengolahan data pada penelitian skrining fitokimia ini dilakukan dengan cara analisis kualitatif yaitu menjelaskan *tanin, flavonoid, alkaloid, steroid dan saponin* dalam batang temen yang berupa perubahan warna yang terjadi pada setiap uji yang dilakukan diolah dengan menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data atau data yang ditampilkan berupa tabel dan naratif.

Untuk menentukan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dihitung dengan menggunakan persamaan.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

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

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu hasil uji fitokimia akan dianalisis secara deskriptif kualitatif sedangkan aktivitas antioksidan akan dianalisis secara deskriptif kuantitatif.