

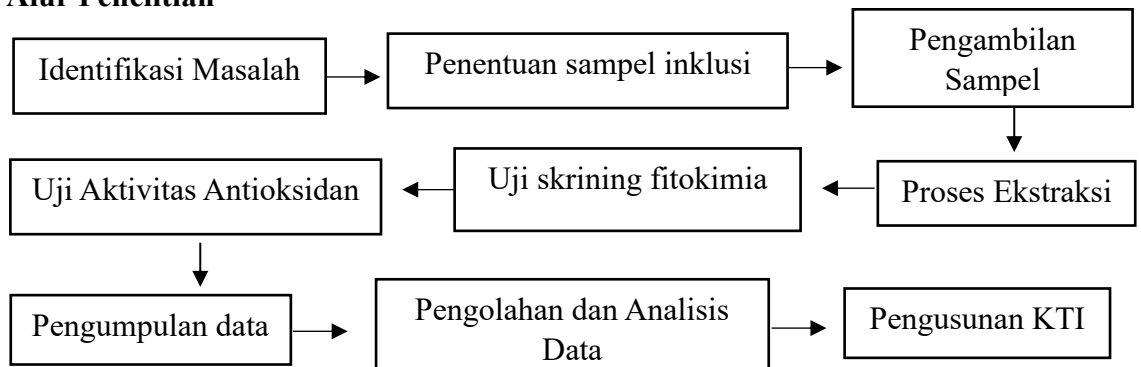
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini ialah deskriptif. Pengujian skrining fitokimia pada ekstrak etanol bunga waru menerapkan metode kualitatif dan uji aktivitas antioksidan pada ekstrak bunga waru secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian deskriptif ini bertujuan untuk menyajikan gejala, fakta dan kejadian secara terstruktur dan akurat. fokus penelitian ini ialah untuk mendeskripsikan proses skrining fitokimia dan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol dari bunga waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn).

B. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian berlangsung mulai November 2023 sehingga April 2024.

D. Sampel Penelitian

1) Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian bunga waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) yang diperoleh dari perkebunan yang terletak di br. taman yoga, desa bajera utara, kecamatan selemadeg, kabupaten tabanan.

2) Kriteria sampel

Kriteria sampel bunga waru yang diterapkan ialah kriteria inklusi yaitu bunga waru yang segar, bunga yang tidak berlubang, bunga yang diambil dari batang pohon, bunga yang memiliki kelopak berbentuk corong dan bunga waru memiliki daun kelopak yang terpisah, mahkota bunga yang mencolok, dan bunga waru yang memiliki aroma yang khas. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu tidak terdapat hama yang menempel disekeliling bunga.



Sumber : Malvaceae (*Mallow family*)

Gambar 5. Sampel Bunga Waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn)

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Dua jenis data yang diterapkan dalam penelitian ini: primer dan sekunder. Komposisi fitokimia dan kapasitas antioksidan ekstrak etanol bunga waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) tercakup dalam data primer. Sedangkan data sekunder berasal dari catatan yang ditemukan di sumber lain.

2. Cara pengumpulan data

Observasi langsung menjadi teknik utama pengumpulan data. Secara spesifik kandungan fitokimia dianalisis secara kualitatif, sedangkan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol bunga waru dianalisis secara kuantitatif.

Tujuan analisis kualitatif ialah untuk menunjukkan dengan tepat karakteristik suatu zat tanpa menjalankan pengukuran kuantitatif terhadapnya (Ayuchecaria et al., 2017). Ilmu kuantitatif, di sisi lain, berfokus pada komponen, fenomena, dan interaksinya melalui penyelidikan sistematis. Penciptaan model dan teori matematika yang berkaitan dengan peristiwa alam merupakan tujuan penelitian kuantitatif. Prosedur yang diterapkan untuk memastikan nilai dan memproses hasil pengukuran, seperti komputasi atau analisis data yang dikumpulkan, disebut sebagai proses pengukuran. Ini menawarkan sinopsis atau solusi terhadap hubungan dasar yang ditemukan dalam hubungan kuantitatif (Ahyyar. 2020).

3. Alat dan bahan

1. Alat

Alat yang diterapkan pada penelitian ini yaitu “APD lengkap (masker, jas laboratorium, haircap, handscoon), blender, timbangan, saringan, toples, neraca analitik, pipet tetes, pipet ukur, tabung reaksi, labu ukur, *rotary evaporator*, spektrofotometer UV-Vis”.

2. Bahan

Bahan yang diterapkan pada penelitian ini yaitu “bunga waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn), etanol 96%, asam sulfat 2N, pereaksi dragendorff, pereaksi mayer wagner, serbuk magnesium, HCl, serbuk DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), pereaksi FeCl_3 5%, amil alkohol dan asam klorida 2N”.

4. Prosedur Penelitian

a. Pengambilan sampel

Bunga waru diambil dari perkebunan di kabupaten tabanan kecamatan selamadeg, bunga yang diambil yaitu dari batang pohon, bunga yang bagus tidak berlubang, bunga yang memiliki lima kelopak berwarna jingga sampel bunga yang diterapkan untuk penelitian sebanyak 3,5 kilo gram.



Sumber : Dokumentasi pribadi

Gambar 6. Bunga Waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn)

b. Pembuatan serbuk simplisia

Bunga waru yang telah didapat disortasi kemudian ditimbang, lalu cuci dengan air yang mengalir dan timbang berat bunga waru yang masih bagus tidak berlubang, bunga yang diterapkan sebanyak 3,5 kilo, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, bunga waru kemudian diserbukan dengan cara blender dan timbang berat keringnya.

c. Proses ekstraksi

Bunga waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) yang segar bagus cantik dipetik kemudian disortasi basah, dicuci, dirajang, timbang berat bunga waru, setelah itu dilanjutkan disortasi kering dan timbang berat sampel, setelah itu blender hingga terbentuk serbuk simplisia. Serbuk simplisia bunga waru diekstraksi menerapkan metode maserasi. Rendam 300 mililiter etanol 96% dengan bubuk simplisia bunga

waru; tutup dan diamkan selama dua hari. Ampas bunga waru didiamkan selama dua hari, kemudian ditambahkan 300 mililiter etanol 96%, ditutup dan didiamkan. Dua hari kemudian, ampas bunga sepatu dan etanol 96% disaring kembali. lalu simpan selama tiga hari. Maserat dikosongkan dan disaring setelah tiga hari penyimpanan. Setelah pembuatan ekstrak kental dengan cara menguapkan maserat yang dihasilkan dalam rotary evaporator bersuhu 50 C, ekstrak tersebut diperiksa aktivitas antioksidan dan skrining fitokimianya (Budiyanto, 2015).

Setelah diperoleh masing-masing ekstrak kental, ditimbang untuk mengetahui nilai rendemennya dan disimpan dalam lemari es hingga dijalankan pemeriksaan lebih lanjut. Rumus persamaan diterapkan untuk menghitung hasil ekstrak

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

d. Skrining fitokimia

Prosedur pemeriksaan skrining fitokimia ekstrak bunga waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn).

1. Pemeriksaan Uji Alkaloid

Dua mililiter ekstrak bunga waru dan lima tetes asam klorida 2 N digabungkan lalu dipindahkan ke dalam tiga tabung yang diidentifikasi sebagai Mayer, Wagner, dan Dragendrof. Selanjutnya, tambahkan tiga hingga lima tetes reagen ke masing-masing tetes. Setelah itu sampel diperiksa. Hasil yang baik jika diterapkan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendrof dan dihasilkan endapan kekuningan (Huliselan dkk., 2015).

2. Pemeriksaan Terpenoid/Steroid

Sampel ditambahkan sebanyak lima tetes, dilanjutkan dengan lima tetes kloroform, sepuluh tetes asam ahidrasetat, tiga tetes asam sulfat kuat, dan dikocok. Pergeseran warna merah menunjukkan hasil positif terhadap steroid atau terponoid (Hanani, 2014).

3. Pemeriksaan Uji Flavonoid

Pada lima tetes sampel, tambahkan 0,1 mg bubuk magnesium (Mg), 0,4 ml amil alkohol, dan 4 ml etanol. Sampel selanjutnya diperiksa. Menurut Huliselan (2015), jika sampel berwarna oranye, maka positif mengandung flavonoid. (Huliselan., 2015).

4. Pemeriksaan Uji Saponin

Satu tetes Hcl 2N ditambahkan setelah lima tetes ekstrak bunga waru, sepuluh tetes air panas, dan pengocokan kuat selama sepuluh detik. Saponin terdapat jika busa terbentuk setinggi 1 hingga 10 cm dan tetap stabil setidaknya selama 10 menit.

5. Pemeriksaan Uji Tanin

Lima tetes FeCl_3 5% diaplikasikan pada sampel; jika sampel berwarna coklat kehijauan atau biru kehitaman, berarti mengandung tanin.

e. Uji aktivitas antioksidan dengan metoda DPPH

Prosedur Uji aktivitas antioksidan ekstrak bunga waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn).

1. Pembuatan larutan DPPH

Timbang 4 mg serbuk DPPH dan larutkan dalam 100 ml etanol 96%, masukkan ke dalam labu takar 50 ml. Absorbansi kemudian diukur menerapkan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm menerapkan larutan stok DPPH untuk pengujian kontrol (Damanis dkk.,2020).

2. Pembuatan larutan stok

Untuk mendapat konsentrasi 1000 ppm, 100 mg ekstrak bunga waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) dilarutkan dalam 100 mg etanol 96%. 150 ppm, 125 ppm, 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm, dan 25 ppm untuk masing-masing konsentrasi.

Perhitungan dijalankan dengan menerapkan rumus pengenceran, sebagai berikut ;

- V1 : Volume awal larutan
- M1 : Konsentrasi awal larutan
- V2 : Volume akhir larutan
- M2 : Konsentrasi akhir

Dengan menerapkan pipet, volume V1 pengenceran diukur pada setiap konsentrasi yang dihitung. Etanol 96% kemudian ditambahkan hingga batas volume tercapai 10 ml. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan alumunium foil agar dapat diterapkan pada tahap pengolahan selanjutnya. (Damanis dkk, 2020).

Contoh pembuatan konsentrasi larutan 100ppm, dihitung menerapkan rumus :

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$200 \times V1 = 100 \times 10$$

Maka, untuk mencari nilai V1 :

$$V1 = 100 \times 10 : 200$$

$$V1 = 5\text{ml}$$

3. Pembuatan larutan kontrol

Dua mililiter larutan DPPH dan dua mililiter etanol 96% ditambahkan ke dalam tabung reaksi untuk membuat larutan kontrol. Aluminium foil ditempatkan di atas tabung reaksi untuk melindunginya dari kontaminasi udara luar. Solusinya kemudian didiamkan dalam ruangan susu selama setengah jam.

4. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metoda DPPH

Bunga Hibiscus tiliaceus Linndiekstraksi dengan etanol sebanyak 0,25 ml pada konsentrasi 25 ppm; proses ini diulangi hingga 150 ppm. Selanjutnya masing-masing ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas, dihomogenisasi selama dua menit, kemudian ditambahkan 1 ml larutan DPPH dalam etanol. Selanjutnya sampel dan DPPH dipindahkan ke dalam tabung reaksi dengan perbandingan 2:2 (2 ml sampel + 2 ml DPPH), dan didiamkan di tempat gelap selama 30 menit. Nilai serapan kemudian harus diturunkan dari 25 ppm menjadi 150 ppm menerapkan spektrofotometer UV-Vis yang diatur pada panjang gelombang 517 nm (Damanis, dkk., 2020).

1. Perhitungan presentase inhibisi dan nilai IC₅₀

Persentase dihitung dengan rumus :

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

Sedangkan persamaan garis kuadrat $y = bx + a$ yang dihasilkan dari persentase penghambatan setiap konsentrasi menghasilkan nilai IC₅₀. Konsentrasi obat yang diukur diwakili oleh nilai x dalam persamaan ini, dan penyerapan sampel yang diukur diwakili oleh nilai y (Rahmatullah dkk., 2019).

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Kajian skrining fitokimia ekstrak etanol bunga waru menerapkan data hasil analisis kualitatif untuk menjelaskan keberadaan *tanin*, *saponin*, *terponoid/steroid*, *alkaloid*, dan *flavonoid*. Data ini ditabulasi dan dianalisis dalam bentuk tabel dan neratif.

Untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan, diterapkan metode DPPH dan dihitung menerapkan persamaan berikut :

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

IC₅₀ (*Inhibition Concentration 50%*) dicari dengan menerapkan garis hambat 50% pada grafik konsentrasi dan persamaan $y=bx+a$, dimana x ialah konsentrasi larutan uji yang mampu menghambat 50% larutan radikal bebas dan $y = 50. \%$ Penghambatan = (kontrol serapan-absorbansi sampel)/(kontrol serapan) x 100%.

2. Analisis data

Analisis data temuan uji fitokimia bersifat deskriptif, sedangkan pemeriksaan aktivitas antioksidan bersifat kualitatif.