

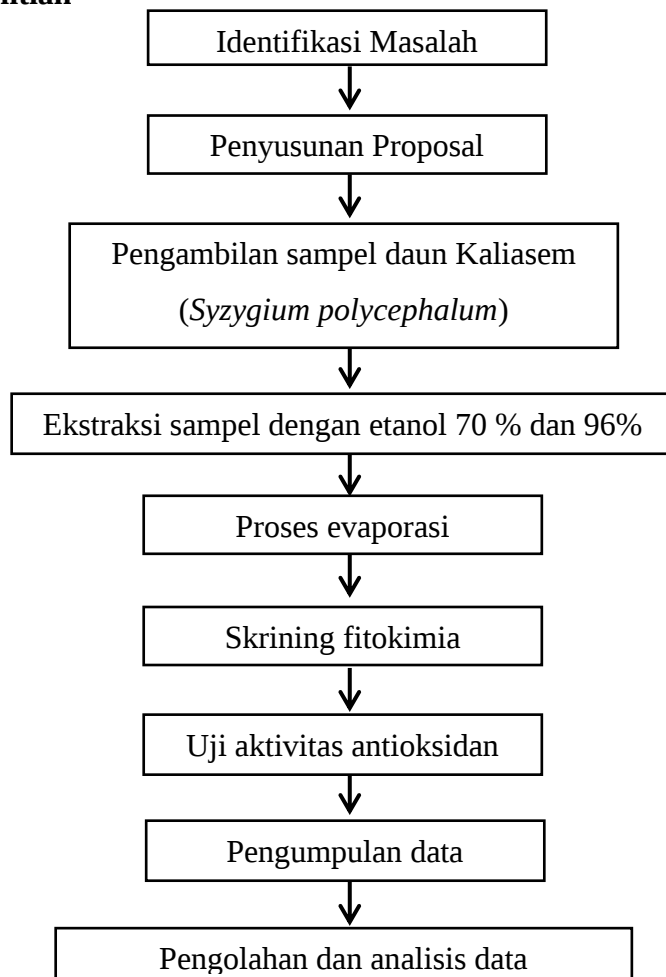
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan metode eksperimental. Menurut Sugiyono (2022), penelitian eksperimen dapat diartikan sebagai metode atau cara untuk mengetahui bagaimana satu perlakuan dapat mempengaruhi yang lain dalam kondisi terkendalikan

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Bagan Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Sampel daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*) berasal Dusun Gunung Kangin, Desa Bangli, Baturiti, Tabanan, Bali. Pemeriksaan skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dilakukan di laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember Tahun 2023 sampai dengan April Tahun 2024.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman Kaliasem (*Syzygium polycephalum*), yang diperoleh dari Dusun Gunung Kangin, Desa Bangli, Baturiti, Tabanan, Bali.

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*) dengan konsentrasi pelarut etanol 70% dan 96%.

2. Teknik pengambilan sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*) yang diperoleh dari Dusun Gunung Kangin, Desa Bangli, Baturiti, Tabanan sebanyak 5 kg bahan baku segar.

- a. Kriteria inklusi dari daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*) yang digunakan adalah daun yang berukuran 15-20 cm, dimana terletak di helai daun kelima dari pangkal, berwarna hijau segar, serta tidak berlubang.

- b. Kriteria eksklusi, yaitu daun yang layu, berwarna kuning dan berjamur.

3. Alat dan bahan

a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu : timbangan duduk, gunting, keranjang buah, ayakan, blender, neraca analitik, toples, Beaker glass (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), corong, pipet volume (Pyrex), pipet ukur, ball pipet, batang pengaduk, tabung reaksi dan rak tabung, hot plate, satu set alat *Rotary Evaporator*, seperangkat alat Spektrofotometer UV-Vis.

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*), etanol 70%, etanol 96%, methanol, aluminium foil, kertas saring, aquades, asam sulfat (H_2SO_4) pekat, reagen Dragendorff, reagen Mayer dan Wagner, serbuk magnesium (Mg), asam klorida (HCl) pekat, asam asetat anhidrat, Besi (III) Klorida ($FeCl_3$) 5%, serbuk DPPH.

4. Prosedur kerja

a. Pra-analitik

1) Pengambilan dan pembuatan serbuk simplisia

Sampel daun kaliasem segar diambil sebanyak 5 kg. Daun dari tanaman Kaliasem yang telah diperoleh, kemudian disortasi sesuai dengan kriteria yang digunakan. Setelah itu dicuci, tiriskan, dicacah dan ditimbang berat daun yang masih segar, setelah itu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering daun Kaliasem kembali disortasi untuk memisahkan sampel dari bahan-bahan lain atau pengotor yang ikut tercampur dalam proses pengeringan. Selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan blender kemudian ditimbang berat keringnya.

Serta dilakukan proses pengayakan untuk mendapatkan simplisia kering dengan ukuran butiran yang seragam.

2) Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan dengan dua perlakuan, perlakuan pertama menggunakan pelarut etanol 70% dan perlakuan kedua menggunakan etanol 96%, dengan perbandingan jumlah serbuk simplisia yang sama dengan melalui proses remaserasi. Serbuk simplisia dimasukkan pada toples sebanyak 400 gram, kemudian direndam dengan 2000 mL etanol atau hingga semua serbuk simplisia terendam lalu ditutup dan dibiarkan selama 2 hari. Setelah 2 hari dilakukan penyaringan filtrat, residu yang diperoleh kembali diekstraksi secara remaserasi dengan cara yang sama dan diamkan selama 2 hari. 2 hari setelahnya, etanol dan ampas kulit daun kaliasem kembali disaring, lakukan hal yang sama kemudian simpan selama 3 hari. Setelah disimpan selama 3 hari maserat dituang dan disaring, filtrat dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 50-60°C, dengan *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. (Sari, Listiani dan Listiani, 2022). Ekstrak kental tersebut ditimbang dan dihitung rendemen ekstrak kentalnya menggunakan rumus:

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

Salah satu indikator mutu ekstrak adalah hasil randemen. Randemen didefinisikan sebagai perbandingan antara jumlah ekstrak yang diperoleh dengan bahan simplisia awal. Semakin tinggi nilai randemen menunjukkan bahwa jumlah ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Syarat randemen ekstrak kental yaitu nilainya tidak kurang dari 10% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

b. Analitik

1) Skrining fitokimia

Pengujian skrining fitokimia dilakukan pada dua sampel ekstrak bahan alam yaitu ekstrak etanol 70% dan 96% daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*). Adapun prosedur uji skrining fitokimia sebagai berikut:

a) Preparasi sampel

Ditimbang 10 gr ekstrak kental daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*). Kemudian ditambahkan 250 mL etanol dimana konsentrasi etanol sesuai dengan jenis pelarut yang digunakan saat proses ekstraksi, diaduk dan saring. Filtrat tersebut siap dilakukan pengujian.

b) Pembuatan blanko

Selain pengujian pada sampel, skrining fitokimia juga perlu dibarengi dengan pengujian blanko, agar dapat membandingkan secara jelas hasil positif dan negatif pada hasil pengujian. Prosedur pengujian blanko sama dengan pengujian sampel, hanya pada saat penambahan sampel diganti dengan etanol dengan konsentrasi sesuai dengan pelarut yang digunakan pada ekstrak.

c) Uji flavonoid

Dipipet 1 mL sampel ekstrak daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*). Kemudian ditambahkan 0,1 mg serbuk Mg, 0,4 mL amil alcohol, dan 4 mL etanol, lalu kocok hingga homogen. Diamati perubahan yang terjadi, hasil positif jika terbentuk warna merah, kuning atau jingga (Sari, R dan AN, 2021).

d) Uji alkaloid

Dipipet 3 mL sampel ekstrak daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*). Kemudian tambahkan 5 tetes HCl, lalu larutan dibagi ke dalam dua tabung reaksi.

Tabung pertama ditambahkan 2 tetes reagen Mayer dan Wagner, hasil positif apabila terbentuk endapan putih kekuningan. Sedangkan tabung kedua ditambahkan reagen Dragendorf, jika hasil positif terbentuk endapan merah-jingga (Cahyani *dkk.*, 2019).

e) Uji terpenoid

Dipipet 1 mL sampel ekstrak daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*). Kemudian ditambahkan 2 mL kloroform, 10 tetes asam asetat anhidrat, dan 3 tetes asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Diamati perubahan yang terjadi, jika positif terbentuk warna merah kemudian berubah menjadi biru hijau (Cahyani *dkk.*, 2019).

f) Uji saponin

Dipipet 1 mL sampel ekstrak daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*). Kemudian ditambahkan 10 mL air panas, lalu kocok campuran selama 10 detik, diamati busa yang muncul selama 5 menit. Apabila masih terdapat busa ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Jika busa yang terbentuk tidak hilang menunjukkan hasil positif (Cahyani *dkk.*, 2019).

g) Uji tanin

Dipipet 1 mL sampel ekstrak daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*). Kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 5%, diamati perubahan yang terjadi. Hasil positif terjadi apabila terjadi perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Manongko, Santi dan Momuat, 2020).

2) Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada dua sampel ekstrak bahan alam dengan konsentrasi etanol yang berbeda yaitu ekstrak etanol 70% dan 96% daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*), dengan prosedur serta perlakuan yang sama.

a) Pembuatan larutan DPPH

Sebanyak 4 mg serbuk DPPH ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan methanol p.a, tepatkan hingga tanda batas (Wati, Prasetya dan Suparningtyas, 2022).

b) Penentuan panjang gelombang maksimum

2 mL larutan DPPH 0,1 mM dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian tambahkan 2 mL methanol p.a., lalu dihomogenkan. Dan diinkubasi pada ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Amalia, Muliasari dan Hidayati, 2023).

c) Pengukuran sampel ekstrak bahan alam

Sebanyak 100 mg sampel ekstrak kental daun Kaliasem (*Syzygium polycephalum*) ditimbang kemudian dilarutkan dengan methanol p.a. pada labu ukur 100 mL hingga tanda batas (1000 ppm). Buat larutan stok dengan masing-masing konsentrasi yaitu 25, 50, 75, 100, 125, dan 150 μ L dengan menambahkan masing-masing larutan dengan methanol mencapai tanda batas (10 mL). Sebanyak 2 mL masing-masing larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH, inkubasi larutan selama 30 menit dalam ruang gelap. Ukur absorbansi sampel pada panjang gelombang maksimum dengan pengulangan sebanyak tiga kali pada masing-masing konsentrasi. Serta diukur larutan blanko

dengan prosedur dan perlakuan yang sama, hanya saja saat penambahan larutan sampel diganti dengan larutan DPPH (Anton, Yudistira dan Siampa, 2021).

c. Post analitik

a) Perhitungan persen inhibisi

Setelah didapatkan nilai absorbansi setiap larutan uji, persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan uji dapat dihitung menggunakan rumus:

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

b) Penentuan nilai IC₅₀

Selanjutnya, persentase inhibisi yang telah diperoleh sebelumnya diplot pada sumbu y dan x persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear ini ditulis sebagai $y = a + bx$, yang digunakan untuk mencari nilai IC₅₀ (Inhibitor Concentration 50%) dari masing-masing sampel dengan mensubstitusi nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh dari IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan besarnya konsentrasi larutan sampel yang diperlukan untuk menghambat radikal bebas DPPH sebesar 50%.

Sebagai contoh, apabila persamaan regresi linear yaitu $y = 0,5231x + 0,7151$, maka:

$$y = 0,5231x + 0,7151$$

$$50 = 0,5231x + 0,7151$$

$$x = \frac{50 - 0,7151}{0,5231} = 94,22$$

Berdasarkan persamaan regresi linear tersebut, hasil dari perhitungan dengan nilai y sebesar 50 akan memberikan nilai x sebagai hasil dari IC₅₀ = 94,22 ppm (Fauziah, Sudirga dan Parwanayoni, 2021).

c) Penentuan nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI)

Perhitungan nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI) diperoleh dengan rumus :

$$AAI = \frac{\text{Konsentrasi DPPH}}{IC_{50}}$$

Berdasarkan nilai IC_{50} yang telah didapat sebelumnya, jika konsentrasi DPPH yaitu sebesar 40 ppm, maka perhitungan nilai AAI yaitu sebagai berikut:

$$\begin{aligned} AAI &= \frac{40 \text{ ppm}}{94,22 \text{ ppm}} \\ &= 0,4 \end{aligned}$$

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data yang diperoleh melalui pengamatan langsung peneliti disebut data primer. Data yang dikumpulkan berasal dari hasil uji kuantitatif dan kualitatif yang menyelidiki fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak daun Kaliasem.

b. Data sekunder

Data sekunder merupakan data yang didapatkan dari hasil penelitian orang lain. Data-data tersebut bisa berupa laporan-laporan dinas kesehatan, riset kesehatan, maupun jurnal-jurnal penelitian orang lain.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu observasi serta pemeriksaan laboratorium. Observasi merupakan teknik pengumpulan data yang berdasarkan suatu pengamatan yang disertai dengan pencatatan-pencatatan. Dalam penelitian ini observasi dilakukan untuk menentukan bahan alam yang akan diteliti. Sedangkan pemeriksaan laboratorium

digunakan untuk memperoleh data hasil uji skrining fitokimia serta uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% dan 96% daun Kaliasem.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen adalah alat yang membantu peneliti dalam proses pengumpulan data. Dalam konteks ini, ada hubungan erat antara pendekatan penelitian yang dipilih dan alat pengukuran yang digunakan. Hasil yang diperoleh dalam penelitian seringkali sangat bergantung pada kualitas alat pengukuran yang digunakan, mengingat data yang terkumpul merupakan elemen sentral dalam proses penelitian dan juga menentukan kualitas hasil penelitian secara keseluruhan. Instrument yang digunakan dalam pengumpulan data pada penelitian ini, yaitu :

- a. Alat tulis
- b. Kamera
- c. Alat untuk skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh dicatat, dikumpulkan, diolah, kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan narasi. Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan teknik analisis data deskriptif dan kuantitatif. Pengolahan data hasil skrining fitokimia dilakukan dengan analisis deskriptif yaitu menjelaskan kandungan senyawa metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin, dan tanin yang terdapat dalam ekstrak daun tanaman Kaliasem. Sedangkan data aktivitas antioksidan metode DPPH diperoleh melalui analisis kuantitatif, yaitu data yang dapat diwujudkan dengan angka yang diperoleh dari lapangan melalui perhitungan-perhitungan.

2. Analisis data

Analisis data dilakukan dengan memasukan data yang telah diolah kedalam tabel pada perangkat lunak komputer untuk dilakukan uji statistik. Untuk melihat apakah variabel pada data yang telah dikumpulkan sudah terdistribusi normal atau tidak diperlukan adanya uji normalitas. Uji normalitas yang digunakan pada penelitian ini menggunakan uji statistik *Saphiro-Wilk Test*. Pengambilan kesimpulan didasarkan pada tingkat signifikansi sebesar 0,05, data dinyatakan berdistribusi normal apabila nilai signifikansi $> 0,05$. Selanjutnya uji hipotesis dilakukan dengan uji t atau uji beda (*Independent Sample T-Test*) jika data berdistribusi normal. Uji ini digunakan untuk mengetahui pengaruh konsenstrasi pelarut etanol terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun tanaman Kaliasem (*Syzygium polycephalum*). Sedangkan apabila data tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan pada uji *Mann-Whitney*. Uji *Mann-Whitney* merupakan alternatif dari uji t untuk dua populasi independen ketika uji normalitas populasi tidak berdistribusi normal. Penarikan kesimpulan didasarkan dengan nilai signifikansi apabila nilai signifikansi $> 0,05$ maka terdapat pengaruh pada dua variabel yang diuji.

G. Etika penelitian

Etika merupakan ilmu tentang adat kebiasaan. Setiap penelitian harus didasarkan pada prinsip etika penelitian. Etika penelitian yang diterapkan pada penelitian ini adalah beneficence dan non maleficence, yaitu prinsip berbuat baik, dengan memberikan manfaat yang sebesar-besarnya dan risiko yang seminimal mungkin untuk orang lain (Haryani dan Setiyobroto, 2022).