

BAB IV

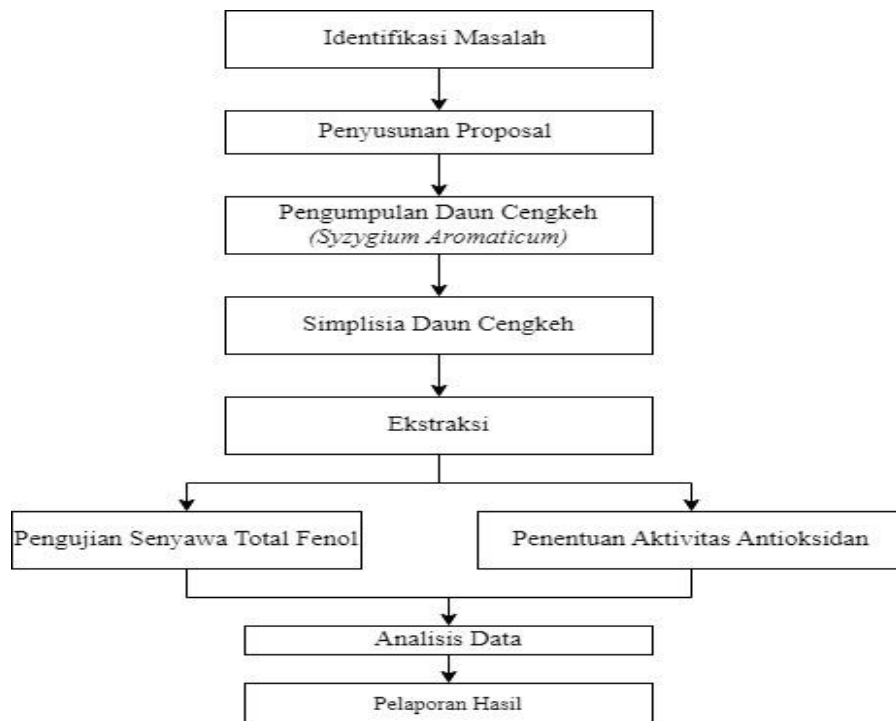
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode quasi eksperimen dengan rancangan *one-group posttest-only* yaitu untuk mengevaluasi perbedaan dari tiga jenis pelarut, yaitu etanol 96%, akuades, dan etil asetat, terhadap kadar total fenol dan aktivitas antioksidan dalam ekstrak daun cengkeh. Pengukuran kadar total fenol dan aktivitas antioksidan dilakukan setelah ekstraksi menggunakan masing-masing pelarut, sehingga memberikan gambaran tentang potensi efek pelarut terhadap sifat-sifat antioksidan dan senyawa fenolik dari tumbuhan yang diteliti.

B. Alur Penelitian

Adapun alur penelitian dari penelitian ini sebagai berikut:



Gambar 3 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian dilaksanakan di Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat Dinas Kesehatan Provinsi Bali dan Laboratorium Kimia Dasar dan Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Denpasar.

2. Waktu

Penelitian ini dimulai pada bulan Agustus 2023 sampai dengan bulan Mei 2024, melalui tahapan pembuatan proposal hingga penyusunan skripsi.

D. Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah kadar total fenol dan aktivitas antioksidan pada berbagai jenis pelarut.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 96%, akuades dan etil asetat dari daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Sampel daun cengkeh yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Pupuan, Kabupaten Tabanan, Bali.

a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi adalah ciri umum populasi target yang terjangkau yang akan diteliti (Nursalam, 2016). Dalam penelitian ini yang termasuk kriteria inklusi, antara lain:

- 1) Daun cengkeh yang diambil dari pucuk daun ketiga sampai keenam
- 2) Daun cengkeh berwarna hijau segar

3) Daun cengkeh yang tidak berlubang dan berjamur

b. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi adalah menghilangkan atau mengeluarkan subyek yang memenuhi kriteria inklusi dari penelitian (Nursalam, 2016)

1) Daun cengkeh yang tidak kering

2) Daun cengkeh yang berlubang dan berjamur

3) Daun cengkeh yang berwarna kuning

3. Besar Sampel

Besar sampel daun cengkeh yang digunakan 6 kg sampel mentah dan digunakan sebanyak 2000 gram serbuk simplisia daun cengkeh yang telah kering dan diserbukan. Kemudian, direndam dalam pelarut etanol 96%, akuades, dan etil asetat masing-masing sebanyak 600 gram serbuk simplisia.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Dalam pelaksanaan penelitian ini, dua jenis data yang digunakan adalah data primer dan data sekunder.

a. Data primer merupakan hasil pengukuran kadar total fenol dan aktivitas antioksidan pada ekstrak daun cengkeh

b. Data sekunder merujuk pada informasi yang diperoleh dari sumber-sumber literatur ilmiah sebelumnya. Data ini mencakup informasi seperti usia pohon cengkeh, ketinggian tempat atau lokasi, jenis tanah, dan berbagai faktor lain yang mempengaruhi senyawa total fenol dan aktivitas antioksidan.

2. Teknik Pengumpulan Data

Dalam penelitian ini, sampel daun cengkeh dipilih menggunakan teknik purposive sampling yaitu dengan memilih sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Pengumpulan data untuk menentukan kadar senyawa total fenol dilakukan melalui metode Folin-Ciocalteu dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Sementara itu, pengumpulan data untuk mengukur aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) juga melalui spektrofotometri UV-Vis.

F. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun cengkeh dalam penelitian ini antara lain peralatan gelas laboratorium merek Pyrex® (meliputi gelas ukur, labu ukur, corong gelas, batang pengaduk, pipet tetes, gelas erlenmeyer, baker gelas, pipet volume) timbangan analitik (LabTech®), incubator (Memmert), oven, blender (Panasonic), rotary evaporator (Heidolph®) dan ayakan

Alat yang digunakan untuk menganalisis kadar total fenol dan aktivitas antioksidan pada ekstrak dalam penelitian ini adalah spektrofotometri UV-Vis (Genesys®), neraca digital analitik (LabTech®), peralatan gelas laboratorium merek Pyrex® (meliputi gelas ukur, beaker gelas, labu takar, corong gelas, batang pengaduk, pipet tetes, gelas erlenmeyer, pipet volume), ball pipet, spatula

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun cengkeh dalam penelitian ini adalah daun cengkeh, aluminium foil, kertas saring (merk Whatman), etanol 96%, aquadest, dan etil asetat.

Bahan yang digunakan untuk menganalisis kadar total fenol dan aktivitas antioksidan pada ekstrak dalam penelitian ini adalah sampel ekstrak bahan alam, reagen Folin Ciocalteu Pro Analisa Merck, Na_2CO_3 7,5%, Asam galat, etanol 96%, akuades dan etil asetat. Sementara bahan analisis aktivitas antioksidan adalah sampel ekstrak bahan alam, DPPH, aluminium foil, etanol 96%, aquades dan etil asetat.

3. Prosedur Kerja

a. Pengambilan dan Pengolahan Sampel Daun Cengkeh

1) Pra Analitik

Sampel bahan alam yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh yang diambil di Desa Pupuan, Kabupaten Tabanan, Bali (Yolanda Simamora dkk., 2021)

- a) Sampel daun cengkeh dibersihkan dari kotoran dengan mencucinya menggunakan air mengalir dan kemudian ditiriskan.
- b) Kemudian, daun cengkeh dipotong menjadi ukuran kecil sekitar 3 cm x 3 cm untuk memudahkan proses pengeringan dan penghancuran.
- c) Setelah itu, daun tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 24 jam.
- d) Selanjutnya, sampel yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk.

- e) Kemudian, bubuk yang dihasilkan diayak menggunakan ayakan berukuran 60 mesh untuk mendapatkan bubuk daun cengkeh.
 - f) Langkah selanjutnya adalah menempatkan hasilnya ke dalam wadah yang tertutup.
- b. Pembuatan Ekstrak
- 2) Analitik
- a) Serbuk simplisia daun cengkeh dimasukkan ke dalam masing-masing wadah sebanyak 400 gram
 - b) Kemudian serbuk di ekstraksi menggunakan berbagai jenis pelarut (etanol 96%, akuades dan etil asetat) sebanyak 2000 ml (perbandingan serbuk simplisia dengan pelarut 1:5)
 - c) Ditutup menggunakan aluminium foil dan dibiarkan selama tiga hari dengan dilakukan pengocokan setiap 8 jam sekali lalu ekstrak disaring
 - d) Ampasnya diremaserasi sebanyak tiga kali dengan perlakuan yang sama
 - e) Filtrat yang dihasilkan digabungkan kemudian dipekatkan menggunakan vacuum rotary evaporator dengan suhu 70⁰C hingga diperoleh ekstrak kental
 - f) Ekstrak kental ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup sebelum digunakan untuk pengujian
- 3) Pasca Analitik
1. Interpretasi hasil
- 1) Diperoleh rendeman ekstrak dengan membandingkan antara massa ekstrak pekat yang diperoleh dengan massa simplisia yang digunakan, menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendeman} = \frac{\text{Bobot ekstrak (gram)}}{\text{Bobot simplisia (gram)}} \times 100$$

2. Pengolahan limbah

- 1) Limbah bahan baku herbal dipisahkan, lalu dikeringkan dan digunakan sebagai pupuk
- 2) Limbah bahan kimia yang digunakan dibuang pada saluran pembuangan khusus

b. Pengukuran kadar total fenol

1) Pra analitik

a) Pembuatan larutan Na_2CO_3 7,5%

- (1) Na_2CO_3 ditimbang sebanyak 3,75 gr
- (2) Kemudian dilarutkan dengan akuades dalam beaker glass $\pm$ 50 ml

b) Pembuatan larutan pembanding

- (1) Serbuk asam galat ditimbang sebanyak 100 mg, ditimbang dengan menggunakan neraca analitik dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 10 ml sehingga diperoleh larutan stok 1000 ppm
- (2) Kemudian dari larutan stok dibuat larutan dengan konsentrasi 100 ppm dipipet sebanyak 500 μL larutan stok kemudian ditambahkan akuades 5 mL
- (3) Kemudian, dibuat konsentrasi bertingkat 12,5; 15; 17,5; 20; dan 22,5 ppm sebagai konsentrasi pemanding. Berikut tabel konsentrasi standar dan volume larutan pada pengukuran ppm.

Tabel 2

Konsentrasi Standar dan Volume Larutan pada Pengukuran ppm

Konsentrasi Standar	Volume Larutan
0 ppm	0 ml (hanya menggunakan akuades)
12 ppm	3 ml

16 ppm	4 ml
20 ppm	5 ml
24 ppm	6 ml
30 ppm	7,5 ml

(4) Setiap konsentrasi diambil sebanyak 1 ml dan ditempatkan ke dalam tabung reaksi.

(5) Kemudian, ditambahkan 1 ml reagen Folin-Cialcalteu, dihomegenkan, dan dibiarkan selama 8 menit.

(6) Selanjutnya ditambahkan 4 ml Na_2CO_3 7,5%, dikocok selama 1 menit

(7) Diukur absorbansi larutan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 768 nm

(8) Larutan tersebut diukur sebanyak tiga kali pada masing-masing konsentrasi. Setelah diperoleh nilai absorbansi, dibuat kurva kalibrasi hingga diperoleh persamaan regresi linear.

2) Pembuatan larutan uji

a) Ekstrak etanol 96%, akuades dan etil asetat ditimbang 100 mg, dilarutkan dengan 10 ml akuades (konsentrasi larutan 1000 $\mu\text{g/ml}$)

b) Dipipet sebanyak 500 μl larutan uji kemudian ditambahkan akuades sebanyak 5 ml (konsentrasi larutan 100 $\mu\text{g/ml}$)

2) Analitik

a) Pengukuran absorbansi menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

1. Disiapkan 6 buah tabung reaksi untuk blanko dan sampel

2. Pada blanko ditambahkan methanol sebanyak 0,2 ml

3. Kemudian pada sampel dipipet masing-masing ekstrak larutan uji sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi
4. Ditambahkan 1 ml pereaksi Folin-Ciocalteu, kemudian didiamkan 8 menit di ruang gelap
5. Ditambahkan 4 ml larutan Na_2CO_3 75%
6. Lalu dihomogenkan dan inkubasi selama 30 menit pada ruang gelap
7. Absorbansi dihitung dengan panjang gelombang 768 nm.
8. Dilakukan tiga kali pengukuran dan diperoleh rata-rata absorbansi

3) Pasca analitik

- 1) Interpretasi hasil pengujian senyawa kadar total fenol

Kadar total fenol diperoleh dari perhitungan nilai absorbansi sampel yang sudah di rata-rata. Hasil rata-rata sampel dianalisis dengan persamaan garis linear asam galat (%) dan rumus TPC (mg GAE/g ekstrak), dengan menggunakan perhitungan berikut:

$$TPC = \frac{x \frac{mg}{L} \times v. sampel (mL) \times FP}{berat sampel (g)}$$

c. Pembuatan larutan aktivitas antioksidan

- 1) Pra analitik

a) Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM

- (1) Larutkan serbuk DPPH sebanyak 10 mg dengan methanol p.a kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL
- (2) Volumnya dicukupkan dengan methanol p.a sampai tanda batas labu ukur 250 (DPPH 0,1 M)

b) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

- (1) Sebanyak 2 mL larutan DPPH 0,1 mM dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- (2) Lalu tambahkan methanol p.a sebanyak 2 mL
- (3) Dikocok dengan vortex hingga homogen lalu dituang ke dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis
- (4) Panjang gelombang maksimum berada pada 517 nm

c) Pembuatan Larutan Blanko

- (1) Sebanyak 2 ml larutan DPPH 0,1 mM dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- (2) Ditambahkan metanol p.a sebanyak 2 mL, dikocok dengan vortex hingga homogen
- (3) Diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit
- (4) Selanjutnya diukur pada panjang gelombang 517 nm

d) Pembuatan larutan uji ekstrak 1000 ppm

- (1) Larutan uji ekstrak disiapkan dengan menimbang 100 mg dari masing-masing ekstrak etanol 96%, akuades, dan etil asetat daun cengkeh.
- (2) Kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sambil diaduk dan di homogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 10 ml hingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm
- (3) Kemudian dilakukan pengenceran dengan variasi konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm dengan cara memipet sejumlah tertentu larutan induk kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Berikut tabel konsentrasi standar dan volume larutan pada pengukuran ppm.

Tabel 3

Konsentrasi Standar dan Volume Larutan pada Pengukuran ppm

Konsentrasi Standar	Volume Larutan
50 ppm	0,5 ml
100 ppm	1 ml
150 ppm	1,5 ml
200 ppm	2 ml
250 ppm	2,5 ml

2) Analitik

1) Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

- (1) Sebanyak 2 mL larutan uji ekstrak etanol 96%, akuades dan etil asetat dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- (2) Tambahkan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL, dikocok dengan vortex hingga homogen
- (3) Lalu diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit
- (4) Selanjutnya, serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm
- (5) Pengukuran ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan pada masing-masing larutan

3) Pasca Analitik

1) Interpretasi hasil penentuan aktivitas antioksidan

Dari nilai absorbansi DPPH, persentase penghambatan radikal DPPH dihitung untuk mendapatkan % inhibisi. Setelah menggunakan % inhibisi kemudian nilai IC₅₀ dihitung. Setelah mendapatkan nilai IC₅₀, nilai AAI

(Aktivitas Antioksidan) dari setiap ekstrak dapat dihitung. Semakin tinggi nilai AAI, semakin kuat aktivitas antioksidan ekstrak tersebut.

(1) Penentuan Persen Inhibisi

Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai persentase inhibisi, yang dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi radikal DPPH} = \left(\frac{\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban bahan uji}}{\text{Absorban kontrol}} \right) \times 100$$

(2) Penentuan Nilai IC₅₀

Konsentrasi sampel dan persentase inhibisinya direpresentasikan pada sumbu x dan y, secara berturut-turut, dalam persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk mengidentifikasi nilai IC₅₀ dengan menetapkan nilai y sebesar 50, dan nilai x yang sesuai dengan IC₅₀ dapat diperoleh.

(3) Penentuan Nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*)

$$AAI = \frac{\text{Konsentrasi DPPH } (\mu\text{g/mL})}{IC_{50} (\mu\text{g/mL})}$$

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

- 1) *Editing*, merupakan tahap evaluasi untuk menilai apakah kriteria data yang diperlukan untuk menjawab pertanyaan penelitian telah memenuhi standar kelengkapan, konsistensi, dan penerapan yang diperlukan.
- 2) *Coding*, adalah tahapan di mana data dikodekan untuk mengonversi informasi kualitatif menjadi format kuantitatif. Pengodean data diperlukan dalam berbagai jenis pemrosesan data, baik melalui metode manual maupun dengan bantuan program komputer.

- 3) *Data entry*, merupakan tindakan menganalisis data yang telah dikode dengan memasukkan informasi tersebut ke dalam program SPSS.
- 4) *Tabulasi data*, merupakan langkah membuat representasi data dalam bentuk tabel sesuai dengan kebutuhan analisis dalam penelitian.

2. Analisis Data

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh berbagai jenis pelarut, termasuk etanol 96%, akuades, dan etil asetat, terhadap tingkat senyawa fenol total dan aktivitas antioksidan. Selain itu, analisis juga bertujuan untuk menentukan hubungan antara aktivitas antioksidan dan kandungan senyawa fenol total. Metode yang digunakan untuk menganalisis data adalah

- a) Uji normalitas menggunakan Kolmogorov Smirnov Test, data dikatakan berdistribusi normal jika nilai sig. > 0,05, Jika data tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis
- b) Apabila hasil sebaran data normal, maka untuk melihat perbedaan kadar dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis dengan uji statistik ANOVA satu arah (*One Way ANOVA*). Sedangkan apabila hasil sebaran data tidak normal, maka masing-masing kelompok perlakuan dianalisis dengan uji statistik Non Parametrik Kruskal Wallis dilakukan untuk mengevaluasi perbedaan yang signifikan antara jenis pelarut (Etanol 96%, akuades dan etil asetat) terhadap kadar fenol total dan aktivitas antioksidan daun cengkeh. H_0 menyatakan bahwa perbedaan jenis pelarut tidak memiliki pengaruh yang signifikan (tidak berbeda nyata), sedangkan H_i menyatakan bahwa perbedaan jenis pelarut memiliki pengaruh yang signifikan (berbeda nyata) terhadap

kadar fenol total dan aktivitas antioksidan daun cengkeh. Kriteria signifikansi ditetapkan sesuai dengan hasil uji statistik.

- c) Analisis Post Hoc Test (Tukey Test), merupakan analisis lanjutan dalam uji One-Way-ANOVA untuk melihat adanya perbedaan yang lebih spesifik antara jenis pelarut terhadap kadar total fenol dan aktivitas antioksidan,
- d) Analisis hubungan kandungan total fenol terhadap aktivitas antioksidan menggunakan analisis Korelasi Pearson