

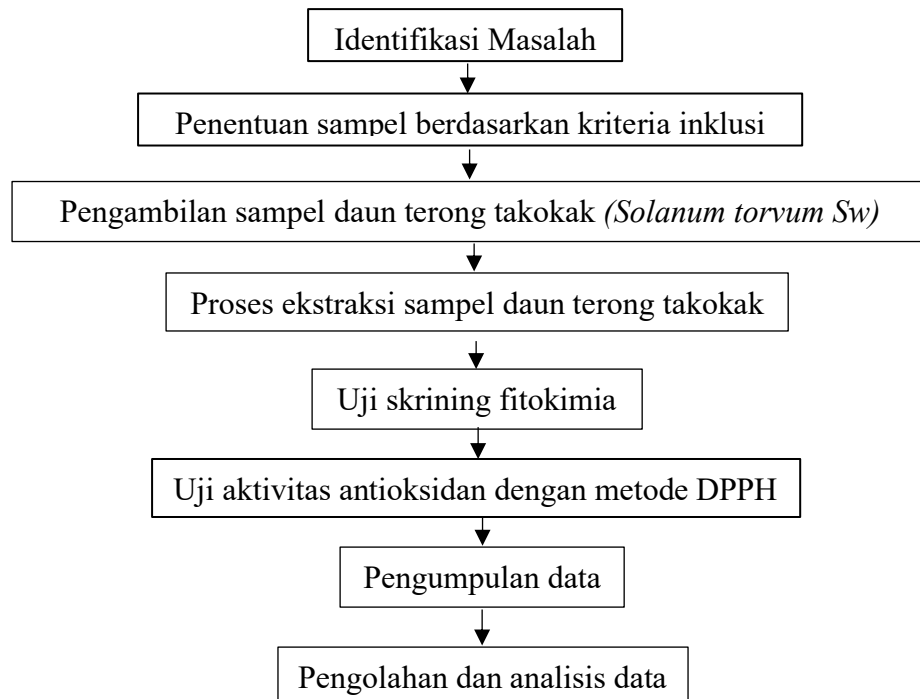
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental, yaitu metode penelitian yang digunakan mengetahui dampak perlakuan dalam produk terkendali atas sampel lainnya (Sugiono, 2016). Studi eksperimental skrining fitokimia dan juga pengujian reaksi antioksidan ekstrak etanol 70% dan 96% daun terong takokak. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan replikasi pengulangan sebanyak tiga kali, dengan variasi konsentrasi yaitu 25, 50, 75, 100, 125, 150 ppm. Peneliti pemilihan variasi konsentrasi tersebut karena jika lebih rendah dari konsentrasi yang ditentukan, peneliti kesulitan dalam pemipetan sampel serta mengetahui konstan hasil nilai absorbansi sampel pada kelipatan 25.

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 Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan dari bulan Januari sampai April 2024.

D. Populasi dan Sampel penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan adalah daun terong takokak (*Solanum Torvum Sw*) yang diperoleh dari Desa Sayan, Ubud, Kabupaten Gianyar, Bali.

a. Unit analisis

Penelitian ini menggunakan unit analisis berupa ekstrak daun terong takokak (*solanum torvum swartz*) dengan konsentrasi pelarut etanol 70% dan etanol 96%.

b. Teknik pengambilan sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun terong takokak (*Solanum Torvum Sw*) yang diperoleh dari Desa Syan, Ubud, Kabupaten Gianyar, Bali.

1) Kriteria inklusi

Terdapat beberapa kriteria inklusi pada penelitian ini meliputi sampel daun terong takokak (*Solanum torvum Sw*) dengan lembaran daun yang utuh, tidak berlubang, warna daun hijau segar dan berukuran 17-20 cm.

2) Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi pada sampel penelitian ini yaitu lembaran daun terong takokak (*Solanum torvum Sw*) yang layu, berwarna kuning, daun berjamur, dan terdapat hama yang menempel di sekeliling daun tanaman. Dengan demikian, sampel yang memenuhi kriteria inklusi yang akan digunakan dalam penelitian ini.



Sumber: dokumentasi pribadi

Gambar 5. Sampel yang Memenuhi Kriteria Inklusi

c. Alat dan bahan

1) Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa alat diantaranya: timbangan, blender, neraca analitik, pipet tetes, batang pengaduk, pipet ukur, rak tabung, tabung reaksi, ball pipet, labu takar, beaker glass, rotary evaporator, kompor listrik, toples, aluminium foil, dan alat spektrofotometer UV-Vis.

2) Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan yaitu daun terong takokak, reagen dragendroff, reagen mayer dan wagner, serbuk magnesium (Mg), asam sulfat (H_2SO_4) pekat, asam klorida (HCl) pekat, asam asetat anhidrida, Besi (III)

Klorida (FeCl_3) 5%, serbuk DPPH, etanol 70 %, etanol 96%, methanol aquades, kertas saring dan tisu.

d. Prosedur kerja

1) Pre analitik

a) Pengambilan sampel

Sampel segar daun terong takokak (*solanum torvum swartz*) diambil sebanyak 4 kg.

b) Pembuatan serbuk simplisia

Daun terong takokak segar yang diperoleh kemudian ditimbang dan disortasi basah menggunakan air mengalir kemudian daun dilakukan pengeringan melalui cara dianginkan dalam suhu ruangan. Sesudah kering, daun terong takokak disortasi kembali dengan tujuan untuk memisahkan sampel dari komponen yang tercampur selama proses pengeringan, selanjutnya daun dihaluskan dengan cara diblender lalu ditimbang berat keringnya.

c) Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan dengan dua perlakuan, perlakuan pertama yaitu dengan memakai etanol 70% dan perlakuan kedua menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan jumlah serbuk simplisia yang sama. Peneliti terlebih dulu akan mengeringkan dan menghaluskan sampel tumbuhan lalu dilakukan ekstraksi terhadap sampel tersebut melalui teknik maserasi dimana perbandingannya yaitu 1:5. Kemudian serbuk simplisia daun terong takokak ditimbang sebanyak 400 gr lalu dilakukan perendaman menggunakan 2000 ml etanol dan ditutup serta ditunggu hingga dua hari. Selanjutnya sampel tanaman yang telah mendapatkan perlakuan akan disaring dan ampas daun terong takokak

akan ditambah 2000 ml etanol dan dilakukan penutupan ulang serta ditunggu hingga dua hari. Sesudahnya ampas daun terong takokak dan Etanol dilakukan penyaringan ulang dan diperlakukan dengan sama serta disimpan dalam waktu 3 hari. Kemudian sesudah 3 hari langkah selanjutnya yaitu melakukan penuangan dan penyaringan maserat. maserat yang dihasilkan akan diuapkan dengan rotary evaporator dengan suhu 50 C agar dihasilkan ekstrak yang kental lalu dilakukan penimbangan dan perhitungan rendemen ekstrak kentalnya (Fitriyanti dkk., 2020).

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

Rendemen adalah perbandingan berat kering produk yang dihasilkan dengan berat bahan baku (Yuniarifin dkk., 2006). Nilai rendemen yang tinggi menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung di dalamnya. Rendemen ekstrak dikatakan baik apabila nilainya tidak kurang dari 10% (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

2) Analitik

a) Skrining fitokimia

Pengujian skrining fitokimia diujikan untuk 2 sampel ekstrak bahan alam yaitu ekstrak etanol 70% dan 96% daun terong takokak (*Solanum Torvum* Swartz). Skrining fitokimia mencakup beberapa pengujian yaitu uji *flavonoid*, *alkaloid*, *terpenoid*, *saponin* dan *tanin*. Menurut Harborne (1987), prosedur uji skrining fitokimia sebagai berikut:

(1) Preparasi sampel

Ditimbang 10 gr ekstrak kental daun tanaman terong takokak (*Solanum Torvum* Sw). Kemudian dilarutkan dalam 250 ml etanol, dimana konsentrasi etanol disesuaikan dengan jenis pelarut yang digunakan saat proses ekstraksi, lalu

aduk dan saring. Filtrat dari daun terong takokak (*Solanum Torvum Sw*) siap untuk dilakukan uji skrining fitokimia.

(2) Pembuatan blanko

Untuk blanko dari flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin dan tanin, prosedur kerjanya sesuai uji sampel. Hanya saja pada saat penambahan sampel diganti dengan etanol sesuai dengan konsentrasi pelarut yang digunakan pada ekstrak.

(3) Flavonoid

Uji flavonid dilakukan dengan menggunakan satu tabung. Sebanyak 1 ml sampel kemudian ditambahkan dnegan 0,1 gr serbuk Mg (seujung spatula), lalu ditambahkan 0,4 ml amil alcohol dan 4 ml etanol lalu kocok hingga homogen. Hasil positif ditunjukkan jika terbentuk endapan berwarna kuning – jingga (Sari dkk., 2021).

(4) Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan sampel ke dalam tabung sebanyak 3 ml kemudian ditambahkan 5 tetes HCl. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 2 tabung, tabung pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff dan tabung kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer dan Wagner. Hasil positif bila terbentuknya endapan merah – jingga pada tabung pertama dan endapan putih kekuningan pada tabung kedua (Cahyani dkk., 2019).

(5) Terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan memasukkan 1 ml sampel ke dalam tabung, lalu ditambahkan 2 ml kloroform, 10 tetes asam asetat anhidrida dan 3 tetes asam

sulfat pekat. Reaksi positif adanya steroid ditandai dengan terbentuknya warna merah kemudian berubah menjadi biru kehijauan (Cahyani dkk., 2019).

(6) Saponin

Pengujian ini dilaksanakan hanya memakai satu tabung. Sampel sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam tabung, lalu ditambahkan 10 ml air panas, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa/buih tinggi 1-10 cm yang stabil selama 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCL 2 N menunjukkan hasil positif saponin (Meigaria dkk., 2016).

(7) Tanin

Pengujian tanin dilaksanakan melalui cara memasukkan sampel 1 ml pada tabung dan menambahkan dua hingga tiga tetes larutan FeCl_3 5%. Reaksi positif adanya tanin memiliki indikasi adanya perubahan warna menjadi biru atau hijau kehitaman (Oktavia dkk., 2020).

b) Uji aktivitas antioksidan

Pengujian ini dilakukan pada dua sampel ekstrak bahan alam yaitu ekstrak etanol 70% dan 96% daun tanaman terong takokak (*Solanum torvum Sw*) dengan perlakuan dan prosedur yang sama.

(1) Pembuatan larutan DPPH

Timbang serbuk DPPH sebanyak 4 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan dengan metanol p.a, tepatkan hingga tanda batas.(Alfira, 2014).

(2) Panjang gelombang maksimum

Dipipet 2 mL larutan DPPH 0,1 mM 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.

(3) Pengukuran sampel ekstrak bahan alam

Sebanyak 100 mg sampel ekstrak kental daun terong takokak (*Solanum Torvum Sw*) 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 ppm dengan ditambahkan 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 3 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., dkk 2021).

3) Post analitik

a) Penentuan % inhibisi, dan nilai Inhibition Concentration (IC₅₀)

Persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi.

Larutan uji dapat dihitung menggunakan rumus:

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

Keterangan:

Absorbansi blanko : Serapan radikal DPPH (blanko) dalam etanol pada panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan.

Absorbansi sampel: Sampel dalam radikal DPPH pada panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan.

b) Penentuan nilai IC_{50}

% inhibisi yang didapat sebelumnya kemudian diplot masing-masing pada sumbu y dan x pada persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear yang didapat dalam bentuk $y = a + bx$. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing sampel dengan mensubstitusi nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh dari IC_{50} . Nilai IC_{50} menyatakan besar konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas DPPH sebesar 50% (Alfira, 2014).

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

$$\begin{aligned}y &= 5,2140x + 3,0215 \\50 &= 5,2140x + 3,0215 \\x &= \frac{50 - 3,0215}{5,2140} \\&= 9,0 \text{ ppm}\end{aligned}$$

Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan hasil nilai $IC_{50} = 9,0 \text{ ppm}$.

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

Nilai AAI dapat ditentukan dengan cara konsentrasi DPPH yang digunakan dalam uji (ppm) dibagi dengan nilai IC_{50} yang diperoleh (ppm).

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

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

Diketahui Konsentrasi DPPH adalah 40 ppm, maka:

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

Artinya aktivitas antioksidan sampel tersebut dengan nilai 4,4 termasuk dalam kriteria AAI yaitu sangat kuat.

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 terong takokak.

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

Data diperoleh dengan cara teknik 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 terong takokak.

3. Instrumen pengumpulan data

Peneliti menggunakan beberapa instrumen untuk memperoleh data yang mencakup kamera, alat tulis, alat untuk skrining fitokimia dan alat uji aktivitas antioksidan.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan teknik analisa data kualitatif dan kuantitatif. Data yang diperoleh dicatat, dikumpulkan, diolah, kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan narasi. 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

Data yang diperoleh akan dikumpulkan dan dianalisis dengan menggunakan SPSS dan dilakukan analisis statistik data. Data yang telah dikumpulkan akan diuji normalitasnya terlebih dahulu dengan uji Shapiro Wilk untuk mengetahui uji parametrik atau non parametrik yang akan digunakan. Uji ini dipilih karena uji ini efektif dan valid digunakan untuk sampel yang berjumlah kecil. Dalam uji Shapiro Wilk disajikan data berdistribusi normal jika nilai $\text{sig} > 0,05$.

Jika data yang diperoleh dari uji normalitas data adalah data yang berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji t-Independent sebagai salah satu uji statistik untuk menguji perbandingan antara 2 kelompok data. Sedangkan, jika uji normalitas menunjukkan data yang tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Adapun hipotesis yang digunakan yaitu:

1) $p \text{ value} \geq 0,05$ maka H_0 diterima H_1 ditolak.

Menunjukkan bahwa variabel independen tidak ada pengaruh yang signifikan terhadap variabel dependen.

2) $p \text{ value} < 0,05$ maka H_0 ditolak H_1 diterima.

Menunjukkan bahwa variabel independen ada pengaruh yang signifikan terhadap variabel dependen.

G. Etika Penelitian

Peneliti menetapkan etika penelitian berdasarkan prinsip beneficence yang berorientasi terhadap tindakan dengan tujuan memberi kebermanfaatan positif untuk pihak lainnya (Karjoko dkk., 2020).