

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian tersebut merupakan penelitian deskriptif, yaitu penelitian yang prosesnya adalah mengidentifikasi, menggambarkan, dan menjawab permasalahan tentang fenomena dan peristiwa yang terjadi saat ini (Arsyam dan Yusuf Tahir, 2021). Pada penelitian ini dilakukan identifikasi, serta menggambarkan hasil skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan pada nano ekstrak etanol daun bidara.

B. Alur Penelitian



Gambar 3 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat pengujian sampel tersebut dilakukan di laboratorium Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) Dinas Kesehatan Provinsi Bali, Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa serta Laboratorium Kimia dan Toksikologi Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian tersebut dilakukan pada bulan Februari sampai dengan April 2025.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan yang dinyatakan dalam nilai IC_{50} dari nano ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus sp.*).

2. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah nano ekstrak daun bidara (*Ziziphus sp.*), yang diperoleh melalui metode gelasi ionik dari ekstrak daun bidara, yang pengambilannya dilakukan di daerah Desa Ungasan, Jimbaran, Kabupaten Badung, Bali. Berdasarkan kriteria inklusi daun yang dipetik sebanyak 3 kg, yaitu dari pucuk daun hingga daun kelima, daun yang segar, berwarna hijau, tidak berlubang. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu daun layu, berwarna kuning hingga coklat, dan terdapat jamur.

3. Teknik sampling

Pengambilan sampel tersebut menggunakan teknik *purposive* sampling, teknik tersebut berpotensi untuk memastikan sampel yang diperoleh memiliki karakteristik yang sesuai dengan kriteria kebutuhan penelitian.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer dan data sekunder. Data primer diperoleh dengan pengujian laboratorium skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dari nano ekstrak daun bidara. Lalu data sekunder diperoleh dari berbagai publikasi ilmiah yang relevan dengan penelitian ini.

2. Cara pengumpulan data

Pengumpulan data pada penelitian tersebut dilakukan secara analisis kualitatif yaitu uji skrining fitokimia untuk menganalisis kandungan metabolit sekunder, serta uji aktivitas antioksidan dengan analisis secara kuantitatif dengan metode DPPH, menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan :

- a. Alat tulis
- b. Alat dokumentasi (kamera)
- c. Alat serta bahan yang diperlukan dalam pembuatan nano ekstrak, uji skrining fitokimia, dan uji aktivitas antioksidan.

4. Alat dan bahan

- a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian tersebut yaitu neraca analitik (*ohaus*), kertas saring, toples, pipet ukur (*pyrex*), pipet tetes, ball pipet (*D&N ball pipet*), beaker glass 500 ml (*Iwaki*), tabung reaksi (*Iwaki*), batang pengaduk, spatula, nampan, oven (*Memmert Germany*), rak tabung, vortex mixer tabung reaksi (*Iwaki*), blender (*Philip*), labu ukur (*Iwaki*), evaporator (*Buchi*), hot plate (*Thermo Scientific*), magnetic stirrer, kuvet, spektrofotometer UV-Vis (*Analytik jena Specord 210 plus*).

b. Bahan

Bahan-bahan yang dipakai adalah daun bidara, etanol 96%, pereaksi mayer, serbuk magnesium, Fe (III) klorida 1 % (Merck), NaOH 2% (Merck), Iodin (Polylab), Pb asetat, serbuk DPPH (*Aldrich*), bubuk kitosan (*Sigma Aldrich*), reagen mayer, reagen wagner, aluminium foil, metanol, bubuk Na-TPP (*Xilong-Scientific*), akuabides (*Onelab*), akuades (*Aqua DM*), HCl (Merck).

5. Prosedur penelitian

a. Ekstraksi

Prosedur tersebut mengacu pada (Habibah dkk., 2023) dengan modifikasi.

Tahap pre-analitik :

1) Pengambilan sampel daun bidara

Sampel daun bidara (*Ziziphus sp.*) yang diambil sesuai kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel daun diperoleh dari Desa Ungasan, Kecamatan Kuta Selatan, Kabupaten Badung. Dengan proses pengambilan sampel yang sesuai dengan kriteria yaitu daun yang segar, berwarna hijau, tidak berlubang, dan tidak busuk.

2) Pembuatan serbuk simplisia

- a) Dilakukan pemilihan sampel daun bidara sesuai dengan kriteria yang ditetapkan
- b) Dilakukan pencucian daun bidara menggunakan air mengalir hingga seluruh kotoran yang menempel hilang
- c) Sampel daun bidara ditiriskan untuk menghilangkan sisa air
- d) Dilakukan pengeringan daun bidara pada suhu ruang tanpa terkena sinar matahari selama 5 hari sambil di balik setiap 2 jam
- e) Dilanjutkan pengeringan lanjutan, pembuatan serbuk daun bidara dilakukan di laboratorium Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO)
- f) Dilakukan penyimpanan hasil serbuk daun bidara pada wadah yang tertutup rapat untuk dilakukan proses selanjutnya.

Tahap analitik :

- 1) Dilakukan penimbangan serbuk simplisia daun bidara sebanyak 400 g
- 2) Dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi, dengan merendam 400 g serbuk simplisia dengan 2 L etanol 96 % dalam wadah tertutup dan didiamkan selama 3 hari
- 3) Dilakukan penyaringan dengan kertas saring untuk memperoleh filtrat yang ditampung untuk diproses evaporasi
- 4) Proses maserasi pada poin 2 hingga 3 diulang sebanyak dua kali, dengan hasil filtrat yang didapatkan digabung
- 5) Dilakukan pemekatan hasil filtrat dengan *rotary evaporator* pada suhu 30°C hingga mendapatkan ekstrak kental

Tahap pasca analitik :

- 1) Dilakukan penimbangan dan perhitungan rendemen pada ekstrak kental yang diperoleh dengan $\text{rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak sampel}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$
- 2) Dilakukan pembuangan limbah sisa proses ekstraksi dan membersihkan alat-alat yang digunakan pada proses ekstraksi
- 3) Bahan-bahan sisa seperti serbuk simplisia daun bidara, dan reagen yang digunakan disimpan pada tempat yang tertutup dan aman

b. Nano ekstrak etanol daun bidara

Prosedur tersebut mengacu pada (Ramadhani dkk., 2021) dengan modifikasi.

Tahap pre-analitik :

- 1) Pembuatan polimer kitosan konsentrasi 0,2%
 - a) Ditimbang bubuk kitosan pada neraca analitik sebanyak 0,2 g
 - b) Pada bubuk kitosan sebanyak 0,2 g dilarutkan dalam 100 mL asam asetat glacial
- 2) Pembuatan larutan Na-TPP konsentrasi 0,1%
 - a) Ditimbang bubuk Na-TPP pada neraca analitik sebanyak 0,1 g
 - b) Pada bubuk Na-TPP sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 100 mL akuabides

Tahap analitik :

- 1) Dilakukan penimbangan pada ekstrak kental daun bidara sebanyak 1 g
- 2) Dilanjutkan dengan melarutkan ekstrak 1 g dengan etanol sebanyak 35 mL yang dicampur dengan 15 mL akuabides
- 3) Ditambahkan dengan larutan kitosan 0,2% sebanyak 50 mL
- 4) Secara perlahan campurkan dengan Na-TPP 0,1% sebanyak 10 mL

- 5) Dihomogenkan dengan magnetic stirer selama 60 menit pada kecepatan 400 rpm
- 6) Dilanjutkan dengan proses sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk memperoleh supernatan
- 7) Dilakukan pengukuran % transmittan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm

Tahap pasca analitik :

- 1) Dilakukan analisis dan pencatatan hasil % transmittan

c. Skrining fitokimia nano ekstrak

Prosedur tersebut mengacu pada (Minocha dkk., 2015; Shaikh dan Patil, 2020) dengan modifikasi.

Tahap pre-analitik :

- 1) Dilakukan persiapan alat dan bahan yang akan digunakan untuk setiap uji
- 2) Pembuatan larutan mayer
 - a) Ditimbang bubuk HgCl_2 sebanyak 1,36 g dan bubuk KI sebanyak 5 g
 - b) Melarutkan 1,36 g dalam 60 ml akuades, dan 5 g dalam 10 mL akuades dalam wadah yang berbeda
 - c) Secara perlahan campurkan dua larutan tersebut
 - d) Ditambahkan air suling agar mencapai volume 100 mL
 - e) Disimpan dalam yang berwarna coklat, dan diberi label
- 3) Pembuatan larutan wagner
 - a) Ditimbang bubuk iodin sebanyak 1,27 g dan bubuk KI sebanyak 2 g
 - b) Dilarutkan dan ditepatkan dengan akuades hingga volume akhir 100 mL

Tahap Analitik :

1) Uji alkaloid

- a) Dilakukan uji mayer dan uji wagner, dipipet nano ekstrak etanol daun bidara masing-masing dipipet sebanyak 1 mL dan masukkan ke dalam tabung
- b) Ditambahkan 1-2 tetes reagen mayer , kemudian tabung uji wagner ditetaskan 1-2 tetes reagen wagner
- c) Dihomogenkan

2) Uji Fenol

- a) Dipipet nano ekstrak etanol daun bidara sebanyak 2 mL
- b) Ditambahkan 3-5 tetes FeCl_3
- c) Dihomogenkan

3) Uji flavonoid

- a) Nano ekstrak etanol daun bidara dipipet sebanyak 1,3 mL ke dalam tabung
- b) Ditambahkan 0,5 gram serbuk magnesium
- c) Dididihkan selama 5 menit

4) Uji saponin

- a) Nano ekstrak etanol daun bidara dipipet sebanyak 10 mL masukkan kedalam tabung reaksi
- b) Ditambahkan 5 mL akuades
- c) Dikocok dengan vortex mixer

5) Uji tanin

- a) Nano ekstrak etanol daun bidara dipipet sebanyak 1,6 mL masukkan kedalam tabung reaksi
- b) Ditambahkan 3-5 tetes larutan timbal asetat
- c) Dikocok hingga homogen

Tahap pasca analitik :

- 1) Dilakukan pengamatan terhadap setiap uji
 - a) Alkaloid , jika menggunakan pelarut mayer maka terdapat endapan putih atau larutan menjadi keruh jika positif, lalu untuk wagner terdapat endapan orange
 - b) Fenol, positif apabila terbentuk warna kehijauan
 - c) Flavonoid, positif apabila adanya perubahan warna dari orange ke merah
 - d) Saponin, positif apabila terbentuk busa yang stabil
 - e) Tanin, positif apabila adanya endapan putih
- 2) Dilakukan pencatatan dan interpretasi hasil uji
- 3) Membersihkan alat-alat yang digunakan pada proses uji skrining

d. Uji aktivitas antioksidan

Prosedur tersebut mengacu pada (Habibah dkk., 2023) dengan modifikasi.

Tahap pre-analitik :

- 1) Pembuatan larutan stock DPPH 0,1 mM
 - a) Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 3,94 mg
 - b) Diencerkan dengan metanol p.a sebanyak 100 mL
- 2) Pembuatan larutan induk sampel
 - a) Dipipet sebanyak 0,5 mL nano ekstrak etanol daun bidara
 - b) Dilarutkan dalam etanol p.a dengan ditetapkan pada labu ukur 10 mL
 - c) Dihomogenkan dengan cara dikocok
- 3) Pembuatan larutan seri konsentrasi
 - a) Larutan nano ekstrak etanol dibuat sebanyak 6 konsentrasi (0,20,40,60,80,100)

- b) Dipipet larutan induk dengan rumus $m_1.v_1 = m_2.v_2$ masing-masing konsentrasi 0,20,40,60,80,100 , masukkan seluruh konsentrasi kedalam lima labu ukur 10 mL sesuai pada Tabel 2

Tabel 2
Pembuatan Seri Konsentrasi Sampel

Konsentrasi(ppm)	Volume Larutan Induk Sampel 500 ppm(mL)	Volume Akhir (mL)
20	0,4	10
40	0,8	10
60	1,2	10
80	1,6	10
100	2	10

- c) Volume labu dipaskan sampai tanda batas dengan metanol
- d) Dihomogenkan
- 4) Pembuatan larutan uji
- a) Untuk konsentrasi 0 ppm dipipet 2 mL metanol, lalu untuk konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, 100 dipipet sebanyak 2 mL dari masing-masing seri
- b) Kemudian untuk semua konsentrasi ditambahkan 2 mL larutan stock DPPH
- c) Dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap

Tahap analitik :

- 1) Serapannya diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm
- 2) Diukur dengan reff dan blank menggunakan metanol, kemudian pengukuran dimulai dari konsentrasi sampel yang paling rendah ke tinggi

Tahap pasca analitik :

- 1) Mengamati hasil absorbansi yang dihasilkan oleh alat dan dihitung nilai nilai IC_{50} menggunakan microsoft excel
- 2) Analisis data hasil

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

a. Skrining fitokimia

Hasil data yang diperoleh akan disajikan dalam tabel, lalu dijabarkan dengan narasi yang berkaitan dengan literatur yang ada. Pada analisis kualitatif untuk uji skrining fitokimia, fokus hanya akan pada perincian hasil uji alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin yang berasal dari nano ekstrak daun bidara.

b. Aktivitas antioksidan

Untuk uji aktivitas antioksidan dilakukan melalui analisis kuantitatif dengan beberapa perhitungan sebagai berikut :

1) Penentuan % inhibisi

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

2) Penentuan nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration*)

Setelah diperolehkan %inhibisi masing-masing konsentrasi sampel, dilanjutkan dengan nilai IC_{50} yang didapatkan dari garis yang mewakili 50% penghambatan, dibuat di sepanjang sumbu konsentrasi, mengikuti rumus $y = ax + b$, di mana y sama dengan 50 dan x menunjukkan konsentrasi larutan yang diuji untuk bisa menghambat 50% dari larutan radikal bebas.

2. Analisis data

Analisis data pada penelitian tersebut dianalisis secara deskriptif, untuk hasil uji skrining fitokimia dianalisis secara deskriptif kualitatif, yaitu menjelaskan kandungan senyawa yang terkandung dalam nano ekstrak etanol daun bidara. Sedangkan untuk hasil uji aktivitas antioksidan dianalisis secara deskriptif kuantitatif, dengan hasil perhitungan akan disajikan dalam bentuk tabel dan dijabarkan secara narasi.