

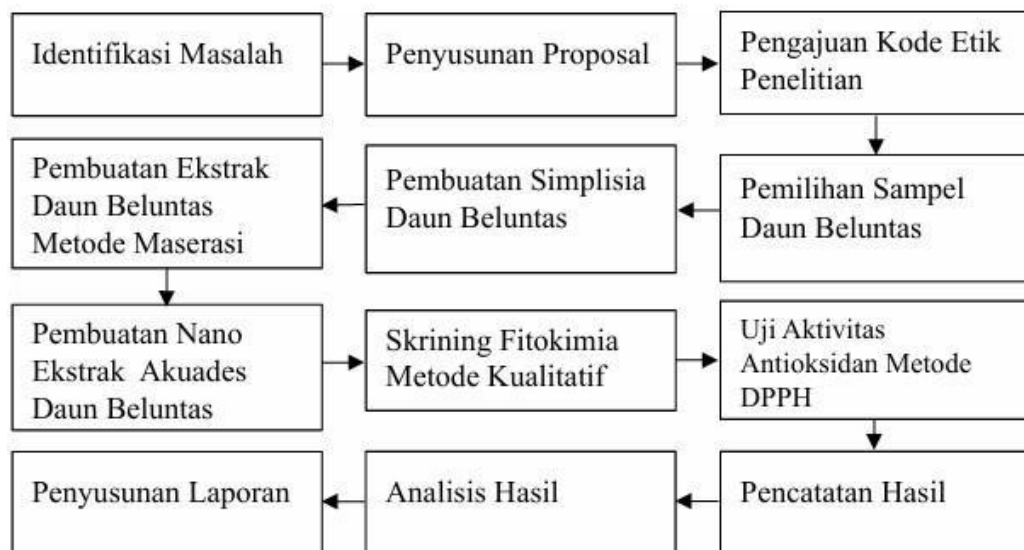
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif, yang menggambarkan tentang kandungan senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan pada sampel nano ekstrak akuades daun beluntas (*Pluchea indica L.*) (Syahrizal dan Jailani, 2023).

B. Alur Penelitian



Gambar 3 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Laboratorium Kimia dan Toksikologi Poltekkes Kemenkes Denpasar, Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa, dan Laboratorium Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat Dinas Kesehatan Provinsi Bali yang terletak di Kabupaten Karangasem.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2024 sampai dengan Maret 2025.

D. Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis pada penelitian ini adalah senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan yang dapat digambarkan dengan nilai IC_{50} dari nano ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica L.*).

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah nano ekstrak akuades daun beluntas (*Pluchea indica L.*). Sampel tersebut didapatkan melalui proses ekstraksi dengan metode maserasi yang dilanjutkan dengan sintesis nano ekstrak menggunakan metode gelasi ionik.

3. Jumlah dan besar sampel

Jumlah total sampel yang digunakan untuk skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan adalah 35,5mL nano ekstrak akuades daun beluntas (*Pluchea indica L.*).

4. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan *purposive sampling*, dikarenakan sampel yang digunakan harus mencapai kriteria yang sudah disesuaikan dengan kebutuhan peneliti. Ada dua tahap untuk mendapatkan sampel yang digunakan dalam penelitian. Tahap pertama merupakan proses ekstraksi menggunakan metode maserasi. Daun yang digunakan pada tahapan ekstraksi merupakan daun yang mencapai kriteria sampel yaitu, mempunyai morfologi daun yang utuh berwarna hijau, tidak berlubang, baru dipetik langsung pada pagi hari, dipetik dari ujung daun hingga 5 helai daun ke bawah, dan lokasi pengambilan daun di Desa Mas. Pada tahap kedua yaitu proses sintesis nano ekstrak, proses ini

dilakukan untuk memperkecil ekstrak menjadi nanoekstrak, metode yang digunakan adalah gelas ionik.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini merupakan data primer dan sekunder. Data primer pada penelitian ini yaitu hasil skrining fitokimia, dan uji aktivitas antioksidan yang dinyatakan dalam nilai IC_{50} . Data sekundernya diperoleh dari sumber literatur, yaitu berupa jurnal dan buku secara digital yang berhubungan dengan penelitian ini.

2. Cara pengumpulan data

Cara pengumpulan data dalam penelitian ini yaitu dengan uji laboratorium untuk mengetahui senyawa fitokimia secara kualitatif, dan aktivitas antioksidan secara kuantitatif.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan pada pengumpulan data pada penelitian ini yaitu alat tulis untuk pencatatan hasil, kamera digunakan untuk mendokumentasikan hasil yang didapat, dan alat bahan untuk skrining fitokimia maupun uji aktivitas antioksidan.

4. Alat dan bahan

a. Alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu pipet ukur (*Pyrex*) 50 mL pipet volume 1 mL, 2 mL, 5 mL (*Pyrex*), pipet tetes, bulb pipet (*D&N ball pipet*), gelas ukur (*Iwaki*) 50 mL, batang pengaduk, spatula, 2 *magnetic stirrer*, ayakan 40 mesh, nampan, botol kaca gelap, beaker gelas (*Iwaki*) 250 mL,

erlenmayer 250 mL (*Iwaki*), tabung reaksi (*Iwaki*), *vortex mixer*, blender (*Philip*), hot plate (*Jisico*), rak tabung reaksi, labu takar (*Iwaki*), evaporator(*Buchi*), neraca analitik (*Ohaus*), oven (*Memmert Germany*), kuvet, dan spektrofotometer Uv-Vis (*Analytik Jena*).

b. Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini yaitu daun beluntas (*Pluchea indica L.*), akuades, kertas label, tissue, aluminium foil, kitosan (*Sigma Aldrich*), Na-TPP (*Xilong-Scientific*), Fe (III) klorida 1%(Merck), gelatin 1%, NaOH 2%(Merck), NaCl 10%(Merck), HCl(Merck), FeCl₃ 5%(Merck), Iodin(Polylab), reagen wagner, reagen mayer, metanol, dan padatan DPPH (*Aldrich*).

5. Prosedur penelitian

Prosedur kerja yang dilakukan pada penelitian ini yaitu :

a. Ekstraksi

Prosedur kerja pembuatan ekstrak dalam penelitian ini mengacu pada Habibah dkk., 2023 dengan modifikasi.

1) Pre-analitik

a) Pengambilan daun beluntas

Pengambilan sampel daun beluntas diperoleh dari tumbuhan beluntas yang dipetik di Desa Mas pada 10 rumah warga agar mendapatkan 2 kg sampel daun beluntas. Sampel daun yang dipilih adalah sampel daun yang memenuhi kriteria sampel.

b) Pembuatan serbuk simplisia

(1) Mencuci daun daun beluntas dengan air mengalir hingga bersih.

- (2) Daun beluntas dilayukan tanpa terkena sinar matahari selama 3 hari.
- (3) Mengeringkan sampel daun beluntas dengan oven suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 20-40 jam hingga benar-benar kering.
- (4) Menghaluskan daun beluntas menggunakan blender.
- (5) Mengayak serbuk agar mendapatkan bubuk yang halus.
- (6) Menyimpan serbuk simplisia pada toples tertutup dan kedap udara pada suhu ruang untuk digunakan lebih lanjut.

2) Analitik

- a) Merendam serbuk simplisia sebanyak 400 gram dengan 2 liter akuades pada wadah tertutup dan dibiarkan selama 3 hari.
- b) Menyaring dan memisahkan filtrat, kemudian filtrat daun beluntas disimpan dalam botol kaca gelap.
- c) Residu(ampas) ditambahkan 2 liter akuades lalu ditutup dan biarkan selama 3 hari. Ulangi proses perendaman hingga dua kali.
- d) Setelah disimpan selama 3 hari maserat dituang dan disaring.
- e) Hasil maserat kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 60°C , hingga dihasilkan ekstrak kental.

3) Pasca analitik

- a) Menimbang ekstrak pekat yang diperoleh
- b) Menghitung persentase rendemen hasil ekstraksi dengan persamaan:

$$\frac{\text{massa ekstrak pekat(g)}}{\text{massa serbuk simplisia(g)}} \times 100\%$$

- c) Mencatat hasil yang diperoleh.
- d) Melakukan penanganan limbah dengan menyimpan sisa pelarut pada kontainer limbah cair.

b. Nano ekstrak

Sintesis nano ekstrak penelitian ini dilakukan mengacu pada Ramadhani dkk., 2021.

1) Pre-analitik

a) Pembuatan polimer kitosan konsentrasi 0,2%.

(1) Menimbang serbuk kitosan pada neraca analitik sebanyak 0,2 g.

(2) Melarutkan 0,2 g kitosan dengan 100 mL asam asetat glasial 1%.

b) Pembuatan larutan Na-TPP konsentrasi 0,1%.

(1) Menimbang bubuk Na-TPP pada neraca analitik sebanyak 0,1 g.

(2) Melarutkan serbuk Na-TPP sebanyak 0,1 g dengan 100 mL akuabides.

2) Analitik

a) Menimbang ekstrak kental daun beluntas sebanyak 1g.

b) Menambahkan larutan etanol p.a sebanyak 35 mL.

c) Menambahkan 15 mL akuades.

d) Menambahkan kitosan 50 mL 0,2%.

e) Ditambahkan secara bertahap dengan Na-TPP 0,1% sebanyak 10 mL sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* kecepatan 400 rpm selama 20 menit.

f) Dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit

g) Mengukur % transmitansi larutan nano ekstrak secara spektrofotometri di panjang gelombang 650 nm.

3) Pasca analitik

a) Mencatat hasil % transmitansi yang didapatkan.

b) Melakukan analisis hasil.

e) Melakukan penanganan limbah dengan menyimpan sisa pelarut pada kontainer limbah cair.

c. Skrining fitokimia

Dalam skrining fitokimia pada penelitian ini merujuk pada Shaikh dan Patil, 2020;Minocha dkk., 2015.

1) Pre-analitik

Alkaloid:

- a) Menyiapkan alat yang akan digunakan yaitu 3 tabung reaksi, dan pipet tetes.
- b) Menyiapkan bahan yang akan digunakan yaitu nano ekstrak akuades daun beluntas (*Pluchea indica L.*), pereaksi wagner, dan pereaksi mayer.
- c) Berikut merupakan cara pembuatan pereaksi:

(1)Pereaksi Wagner:

- (a)Menimbang sebanyak 1,27 g iodin dan 2 g kalium iodida,
- (b)Tepatkan dengan akuades hingga volume akhir 100 mL
- (c)Simpan dalam botol berwarna coklat.

(2)Pereaksi mayer:

- (a) Menimbang 1,36g HgCl₂ lalu dilarutkan dalam 60 mL akuades.
- (b) Pada bagian lain dilarutkan pula 5 g KI dalam 10 mL akuades.
- (c) Kedua larutan ini kemudian dicampurkan dan diencerkan dengan akuades sampai 100 mL.
- (d) Pereaksi ini disimpan dalam botol yang berwarna coklat, agar tidak rusak terkena cahaya.

Flavonoid:

- a) Menyiapkan tabung reaksi, pipet tetes, spatula, dan neraca analitik.

- b) Menyiapkan bahan yang akan digunakan yaitu nano ekstrak akuades daun beluntas (*Pluchea indica L.*), NaOH 2%, dan HCl encer.

Tanin:

- a) Menyiapkan tabung reaksi, dan pipet tetes.
- b) Menyiapkan bahan yang akan digunakan yaitu nano ekstrak akuades daun beluntas (*Pluchea indica L.*), akuades, larutan gelatin 1%, dan NaCl 10%.

Saponin:

- a) Menyiapkan alat yang diperlukan yaitu tabung reaksi, dan pipet tetes.
- b) Menyiapkan bahan yang digunakan yaitu nano ekstrak akuades daun beluntas (*Pluchea indica L.*), dan air.

Fenol:

- 1) Menyiapkan terlebih dahulu alat yang akan digunakan seperti, pipet tetes, spatula, dan neraca analitik, dan 2 buah tabung reaksi.
- 2) Menyiapkan bahan yang akan diperlukan seperti :

Uji FeCl_3 : Larutan FeCl_3 dan sampel nano ekstrak akuades daun beluntas.

2) Analitik

Alkaloid:

- a) Nano ekstrak akuades daun beluntas yang diperoleh dibagi ke dalam 3 tabung reaksi,
- b) Tabung pertama berfungsi sebagai blanko, ditambahkan dengan 3 tetes HCl 2 N,
- c) Tabung kedua ditambahkan 1mL pereaksi wagner, dan
- d) Tabung ketiga ditambahkan 1-2 tetes pereaksi Mayer
- e) Diamati dan dibaca perubahan warna yang terjadi.

Flavonoid:

Nano ekstrak akuades daun beluntas dipipet sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 2 mL NaOH 2%, dan tambahkan 3-5 tetes HCl encer.

a) Diamati dan dibaca perubahan warna yang terjadi.

Tanin:

a) Nano ekstrak akuades daun beluntas dilarutkan pada akuades 5mL sebanyak 50mg, kocok dan tambahkan 1mL larutan gelatin 1% dan 1mL NaCl 10%.

b) Diamati dan dibaca perubahan warna yang terjadi.

Saponin:

a) Nano ekstrak akuades daun beluntas 0,5g dilarutkan dengan 2mL air, kocok hingga terbentuk busa stabil selama 10 menit.

b) Diamati dan catat hasil yang didapat.

Fenol:

a) Ke dalam tabung 2 dimasukkan 1 mL nano ekstrak akuades daun beluntas, kemudian ditambahkan 3-5 tetes larutan $FeCl_3$ 5%.

b) Diamati dan catat hasil yang didapat.

3) Pasca analitik

a) Berikut merupakan hasil pengamatan yang diharapkan:

- Alkaloid: adanya alkaloid akan menghasilkan endapan berwarna merah kecoklatan pada pereaksi wagner, dan endapan putih pada reagen mayer.
- Flavonoid: adanya flavonoid akan memberikan warna orange
- Tanin: adanya tanin akan memberikan warna hijau kehitaman
- Saponin: adanya saponin ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1-10 cm tidak kurang dari 10 menit.
- Fenol: adanya fenol akan memberikan warna biru kehitaman.

- b) Mencatat hasil yang didapat.
- c) Melakukan penanganan limbah.
- d. Uji aktivitas antioksidan

Uji antioksidan dalam penelitian ini mengacu pada Habibah dkk., 2023 dengan modifikasi.

1) Pre-analitik

a) Pembuatan Larutan Induk Sampel

- (1)Dibuat larutan uji dalam berbagai konsentrasi dengan larutan induk 5000 ppm nano ekstrak daun beluntas,
- (2)Sampel nano ekstrak akuades daun beluntas dibuat dengan melarutkan 0,5 mL sampel pada 10 mL akuades,
- (3)Melakukan pengenceran menggunakan metanol untuk membuat variasi konsentrasi sampel sesuai tabel:

Tabel 2
Pembuatan Seri Konsentrasi Sampel

Konsentrasi (ppm)	Volume larutan induk sampel	Volume akhir (ml)
	500ppm (ml)	
30	0,6	10
60	1,2	10
90	1,8	10
120	2,4	10
150	3	10

b) Menyiapkan larutan DPPH 0,1 mM.

- (1)Menimbang padatan DPPH sebanyak 3,94 mg.
- (2)Dilarutkan dengan metanol 100 mL dalam labu ukur sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,1 mM.

2) Analitik

Penentuan aktivitas antioksidan sampel nano ekstrak daun beluntas terhadap DPPH.

- a) Larutan seri konsentrasi sampel dipipet masing-masing 2 mL.
- b) Ditambahkan dengan 2mL larutan DPPH, dimasukkan pada tabung reaksi semua sampel dibuat triplo lalu ditutup dengan rapat.
- c) Larutan dihomogenkan dan diinkubasi 30 menit di tempat gelap, pada suhu ruang hingga terjadi perubahan warna dari aktivitas DPPH.
- d) Serapan diukur secara spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 516 nm.

3) Pasca analitik

- a) Menghitung % inhibisi seri konsentrasi sampel
- b) Membuat persamaan regresi linier antara seri konsentrasi sampel (ppm) dan menentukan nilai IC_{50}
- c) Melakukan interpretasi nilai IC_{50}
- d) Melakukan penanganan limbah.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

a. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dinyatakan secara kualitatif dengan tanda positif atau negatif. Positif jika sampel menunjukkan reaksi terhadap pereaksi yang digunakan, ini menandakan bahwa terdapat senyawa metabolit sekunder pada sampel.

b. Uji aktivitas antioksidan

Pengolahan data aktivitas antioksidan metode DPPH dihitung dengan penentuan % inhibisi, dengan menggunakan persamaan:

$$\% \text{inhibisi} = \frac{\text{Absorban blanko} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban Blanko}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan hasil % inhibisi disetiap konsentrasi seri sampel, hasil tersebut dibuat pada persamaan linier $y = ax + b$. Hasil persamaan linier yang di dapat dipergunakan untuk mendapatkan nilai IC_{50} . Persamaan untuk menghitung nilai IC_{50} adalah $50 = ax + b$. Penggolongan kategori hasil berdasarkan Nilai IC_{50} dibuat berdasarkan Tabel 3.

Tabel 3
Penggolongan Kategori Hasil Berdasarkan Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} (ppm)	Kategori
<50	Sangat Kuat
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah
>200	Sangat Lemah

2. Analisis data

Data dari skrining fitokimia dianalisis secara deskriptif kualitatif untuk menjabarkan senyawa metabolit sekunder yang ada dalam nano ekstrak daun beluntas. Sementara itu, kandungan aktivitas antioksidan pada nano ekstrak tersebut disajikan dengan bentuk deskriptif kuantitatif. Perhitungan aktivitas antioksidan dapat menggunakan persamaan linier, dan hasil yang didapat dikelompokkan berdasarkan kategori IC_{50} .