

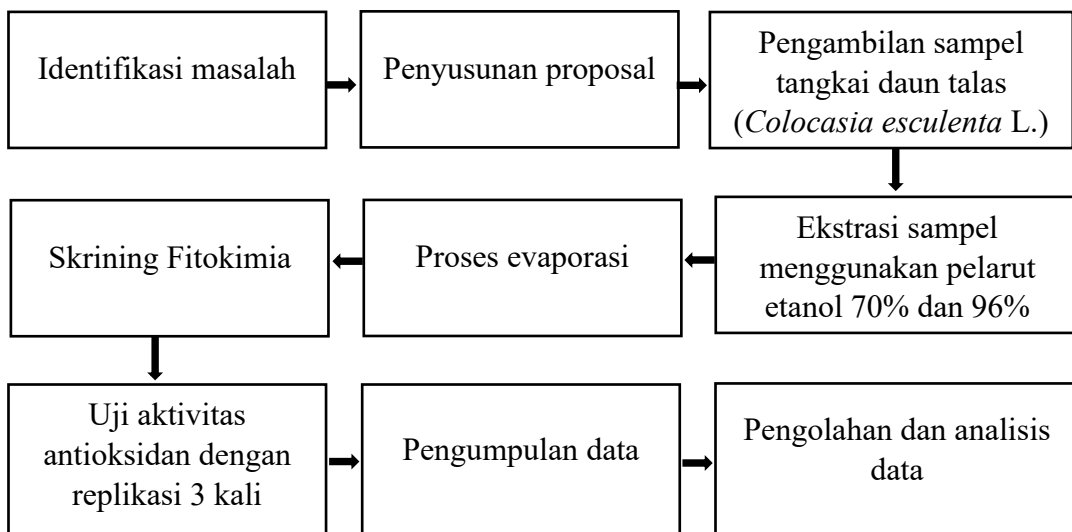
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Pendekatan kuantitatif adalah metode yang diimplementasikan dalam studi ini dengan mengimplementasikan metode eksperimental. Penelitian eksperimental bermaksud untuk mengidentifikasi hubungan sebab-akibat antara variabel X dan Y. Variabel bebas dikendalikan untuk menganalisis pengaruh yang ditimbulkan pada variabel terikat (Akbar *et al.*, 2023).

B. Alur Penelitian



Gambar 4. Bagan Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Sampel tangkai daun talas (*Colocasia esculenta* L.) didapat di desa Selabih, Tabanan, Bali. Skrining fitokimia dan pemeriksaan uji aktivitas antioksidan pada

tangkai daun talas (*Colocasia esculenta* L.) dijalankan di laboratorium kimia dasar dan laboratorium kimia terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini berlangsung pada bulan November 2024 - April 2025.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi yang dipergunakan merupakan tanaman talas (*Colocasia esculenta* L.) yang di bisa dari desa Selabih, Tabanan, Bali.

2. Sampel

a. Unit analisis

Unit analisis pada penelitian ini merupakan aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% dan 96% tangkai daun talas.

b. Besar sampel

Besar sampel yang dipergunakan yakni 10 kg tangkai daun talas (*Colocasia esculenta* L.) yang memuat 2 perlakuan, yakni ekstrak etanol 70% dan 96% tangkai daun talas dengan menggunakan 6 perlakuan, yakni 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, dan 150 ppm. Hanafiah (2016) memaparkan bahwasanya jumlah minimal replikasi yang dipakai dalam percobaan laboratorium adalah cukup 3 kali replikasi. Pada penelitian ini dijalankan replikasi sejumlah 3 kali dan diperlakukan secara setara.

c. Teknik pengambilan sampel

Sampel yang dipergunakan merupakan tangkai daun talas yang didapat di desa Selabih, Tabanan, Bali. Penelitian ini menggunakan teknik sampel *Purposive Sampling*. Teknik ini menggunakan kriteria yang sudah ditentukan oleh peneliti, yakni:

- 1) Kriteria inklusi dari tangkai daun talas yang dipakai merupakan tangkai yang masih segar dengan ukuran 60-150 cm, memiliki warna hijau dengan batas masa penyimpanan maksimal 7 hari pada pendingin atau pada suhu ruang.



Sumber: Dokumentasi Pribadi

Gambar 5. Pengukuran tangkai daun talas

- 2) Kriteria eksklusi yang dipakai merupakan tangkai yang sudah kering dan mengkerut dan aroma khas tangkai daun talas sudah menghilang. Sehingga, sampel yang memenuhi kriteria inklusi akan dipilih.

d. Alat, bahan, dan prosedur kerja

1) Alat

Alat yang dipergunakan yakni: Spektrofotometer Uv-Vis (1), neraca analitik (1), blender (1), satu set alat *rotary vacuum evaporator* (1), gelas arloji (1), pipet volume 1 ml (1), pipet volume 10 ml (1), pipet volume 100 ml (1), pipet ukur 1 ml (1), pipet ukur 5 ml (1), pipet ukur 10 ml (1), pipet tetes (5), bulb (1), batang pengaduk (1), spatula (1), Beaker gelas (5), tabung reaksi (20), rak tabung reaksi (5), labu ukur 10 ml (10), labu ukur 50 ml (2), dan labu ukur 200 ml (1).

2) Bahan

Bahan yang dipergunakan yakni: ekstrak tangkai daun talas, pelarut etanol 70%, pelarut etanol 96%, metanol, DPPH, asam askorbat, aquadest, dan aluminium foil.

3) Prosedur kerja

a) Pra-analitik

(1) Ekstraksi Maserasi

Sampel tangkai daun talas yang sudah dikumpulkan, pertama-tama dicuci hingga bersih, kemudian ditimbang dan dipotong tipis-tipis. Sesudah pemotongan, sampel ditimbang kembali dan diangin-anginkan atau dioven pada suhu maksimal 50°C. Sesudah kering sempurna, sampel ditimbang lagi dan dihaluskan dengan blender. BPOM (2019) memaparkan bahwasanya Ekstrak bisa dikatakan baik sebagai simplisia kering dan bisa dilakukan maserasi, bila kandungan kadar air $\leq$ 10%. Bahan kering yang sudah dihaluskan dibagi dua sebelum maserasi, lalu direndam dalam etanol 70% dan 96%. Proses ini berlangsung selama 7 hari di tempat gelap pada suhu ruang, dimana maserasi pertama berlangsung selama 5 hari dan remaserasi berlangsung selama 2 hari. Setelahnya, maserat disaring dan

diuapkan dengan evaporator hingga didapat ekstrak kental. Ekstrak itu selanjutnya ditimbang dan rendemennya dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{Bobot ekstrak kental (gr)}}{\text{Bobot simplisia yang diekstraksi (gr)}} \times 100\%$$

b) Analitik

(1) Skrining fitokimia

(a) Preparasi sampel

Sejumlah 10 gr ekstrak kental tangkai daun talas ditimbang dan tambahkan 250 mL etanol 70% dan 96%, setelahnya campuran itu diaduk merata dan saring. Filtrat itu siap diuji.

(b) Pembuatan blanko

Di lain sisi, skrining fitokimia juga harus dilakukan bersamaan dengan uji blanko. Langkah ini penting agar hasil positif dan negatif pada pengujian bisa dibandingkan dengan lebih jelas. Prosedur pengujian blanko dilakukan dengan cara yang sama seperti pengujian sampel, tetapi pada tahap penambahan sampel, yang dipakai sebagai pengganti adalah etanol 70% dan 96%.

(c) Uji flavonoid

Campurkan 10 tetes ekstrak etanol tangkai daun talas dengan 2 tetes HCl pekat, serbuk Mg, dan amil alkohol dalam tabung reaksi. Bila lapisan amil alkohol berwarna kuning, oranye, atau merah, berarti sampel mengandung flavonoid.

(d) Uji alkaloid (mayer)

Campurkan 10 tetes ekstrak, sejumlah tetes HCL 2N, dan 2-3 tetes reagen Mayer ke dalam tabung reaksi. Perolehan positif ditandai dengan adanya endapan warna putih kekuningan yang memperlihatkan adanya kandungan senyawa alkaloid.

(e) Uji alkaloid (dragendorf)

Campurkan 10 tetes ekstrak, sejumlah tetes HCL 2N, selanjutnya tambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorf ke dalam tabung reaksi. Perolehan positif akan berwarna jingga atau merah kecoklatan yang memperlihatkan adanya senyawa alkaloid.

(f) Uji tanin

Campurkan 10 tetes ekstrak, dan 2 tetes larutan FeCl_3 1% ke dalam tabung reaksi. Hasil positif diperlihatkan dengan adanya perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman, yang menandakan adanya kandungan senyawa tanin

(g) Uji saponin

Dalam tabung reaksi, campurkan 10 ml air mendidih dengan 10 tetes ekstrak tangkai daun talas. Setelah dikocok selama sepuluh detik, tunggu lima menit untuk melihat apakah terbentuk busa yang stabil. Adanya saponin dalam sampel diindikasikan jika busa tetap terlihat setelah menambahkan satu tetes larutan HCL 2N.

(h) Uji terpenoid dan Steroid

Setelah menambahkan 3 mL H_2SO_4 jenuh secara hati-hati untuk membuat lapisan, 5 mL ekstrak dan 2 mL kloroform ditambahkan. Hasil yang baik untuk terpenoid akan ditunjukkan dengan terbentuknya warna cokelat kemerahan pada permukaan (Abdalla *et al.*, 2020). Namun, untuk steroid, tambahkan 2 mL ekstrak, diikuti dengan 1 tetes H_2SO_4 pekat dan 3 tetes HCl pekat. Setiap larutan positif mengandung steroid jika berubah menjadi hijau (Ergina & Pursitasari, 2014).

(2) Uji Aktivitas Antioksidan

(a) Pembuatan larutan DPPH Konsentrasi 40 ppm

4 mg bubuk DPPH harus ditimbang, kemudian ditambahkan ke labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan metanol p.a. hingga batas tercapai. (Wati *et al.*, 2022).

(b) Penentuan panjang gelombang maksimum

Pindahkan 2 mililiter larutan DPPH 0,1 mM ke dalam tabung reaksi menggunakan pipet. Setelah menambahkan 2 mL metanol p.a., aduk cairan hingga merata. Selama setengah jam, inkubasi larutan dalam lingkungan yang gelap. Selanjutnya, gunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 517 nm (Amalia *et al.*, 2023).

(c) Pengukuran sampel ekstrak bahan alam

Setelah ditimbang dan dilarutkan 100 mg ekstrak kental tangkai daun talas dengan metanol p.a. dalam labu ukur 100 mL hingga mencapai tanda batas, konsentrasinya mencapai 1000 ppm. Selanjutnya, tambahkan masing-masing larutan dengan metanol hingga mencapai tanda batas (10 mL) untuk membuat larutan stok dengan berbagai konsentrasi, khususnya 25, 50, 75, 100, 125, dan 150 μ L. Sebanyak 2 mL masing-masing larutan harus ditempatkan dalam tabung reaksi, diikuti dengan 2 mL larutan DPPH. Larutan tersebut kemudian harus diinkubasi selama 30 menit dalam lingkungan yang gelap. Ulangi tiga kali pengulangan untuk menentukan absorbansi sampel pada panjang gelombang maksimum (517 nm) untuk setiap konsentrasi. Di lain sisi, ukur larutan blanko (DPPH) menggunakan prosedur dan perlakuan yang sama.

(d) Penentuan % inhibisi

Aktivitas penangkal radikal bebas suatu senyawa antioksidan dinyatakan sebagai % inhibisi radikal DPPH yang bisa dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100 \%$$

Tabel 4. Penentuan % inhibisi

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Sampel			Absorbansi DPPH	% Inhibisi		
		Pengulangan				Pengulangan		
		1	2	3		1	2	3
1	25							
2	50							
3	75							
4	100							
5	125							
6	150							

(e) Penentuan IC₅₀

Nilai IC₅₀ dihitung melalui penggunaan persamaan regresi linier, di mana konsentrasi sampel dipakai sebagai sumbu x dan persentase inhibisi (% inhibisi) sebagai sumbu y. Berdasarkan persamaan $y = a + bx$, nilai IC₅₀ didapat dengan menggantikan $y = 50$. Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC₅₀ yang didapat dari sampel dan di klasifikasi menjadi 5 kategori, yakni:

Tabel 5
Kategori Nilai IC₅₀ pada Aktivitas Antioksidan

Nilai IC ₅₀ (ppm)	Kategori
<50	Sangat kuat
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah
>200	Sangat lemah

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

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

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

Selain menggunakan nilai IC₅₀ untuk memperlihatkan besar aktivitas antioksidan pada sebuah ekstrak, dipakai pula nilai AAI. Nilai AAI di klasifikasikan menjadi 4 kategori, yakni:

Tabel 6
Kategori Nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI)
pada Aktivitas Antioksidan

Nilai AAI (ppm)	Kategori
<0,5	Lemah
0,5-1	Sedang
1-2	Kuat
>2	Sangat kuat

c) Pasca-analitik

- (1) Kumpulkan dan catat data dari hasil analisis dan pengujian laboratorium.
- (2) Lakukan pengolahan data dan analisis data agar bisa menyimpulkan hasil penelitian.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer adalah sebuah informasi yang didapatkan dari pengamatan langsung oleh peneliti. Data primer pada penelitian ini didapat dari percobaan laboratorium. Data yang didapat adalah hasil uji kuantitatif aktivitas antioksidan tangkai daun talas (*Colocasia esculenta* L.).

b. Data sekunder

Data sekunder adalah informasi yang didapatkan dari penelitian yang dijalankan oleh orang lain. Informasi ini berbentuk penelitian kesehatan, laporan pelayanan kesehatan, ataupun jurnal penelitian lain.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang dipergunakan melibatkan penelitian observasional dan laboratorium. Observasi adalah teknik pengumpulan data yang dijalankan melalui pengamatan objek atau fenomena secara langsung, diikuti dengan pencatatan kondisi atau perilaku objek yang diamati. Dalam studi ini, observasi dijalankan agar mempelajari bahan alam yang menjadi objek penelitian. Di lain sisi, penelitian di laboratorium bertujuan memberi informasi terkait hasil dari uji aktivitas antioksidan pada tangkai daun talas (*Colocasia esculenta* L.).

3. Instrumen pengumpulan data

Instrument merupakan alat yang dipergunakan untuk mempermudah peneliti mengumpulkan data. Dalam konteks ini, ada hubungan yang erat antara pendekatan yang dipergunakan dengan instrumen pengukuran. Perolehan yang didapatkan biasanya dipengaruhi oleh kualitas alat pengukuran, sebab data yang didapatkan adalah elemen utama dalam proses penelitian dan menentukan kualitas keseluruhan hasil penelitian. Instrumen yang dipergunakan untuk mengumpulkan data pada penelitian ini berupa:

- a. Alat tulis
- b. Kamera
- c. Alat untuk uji kualitas aktivitas antioksidan

F. Pengolahan dan Analisis data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh dikumpulkan, diproses, disimpan, dan ditampilkan dalam bentuk laporan dan tabel. Teknik analisis data deskriptif dan kuantitatif digunakan dalam penelitian ini. Analisis deskriptif, yang berupaya menjelaskan kandungan komponen metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, dan steroid yang termasuk dalam ekstrak tangkai daun talas, digunakan untuk memproses data skrining fitokimia. Di lain sisi, untuk pengolahan data yang didapat selama uji aktivitas antioksidan mempergunakan metode DPPH (*2,2-difenil-2-pikrilhidrazil*) dengan sampel tangkai daun talas, data itu dianalisis secara kuantitatif, yakni dengan mengubah hasil pengukuran menjadi angka-angka dari perhitungan lapangan.

2. Analisis data

Data dari percobaan dianalisis secara kuantitatif agar mengevaluasi perbedaan pelarut etanol 70% dan 96% pada aktivitas antioksidan. Uji normalitas dijalankan mempergunakan uji *Shapiro-Wilk*, dan bila $\text{sig} > 0,05$, data dianggap normal dan uji *t independent test* diterapkan untuk menguji perbedaan pelarut etanol. Bila data tidak normal, uji *Mann-Whitney* dipergunakan. Kesimpulan diambil berdasarkan nilai signifikansi, di mana bila $< 0,05$, memperlihatkan adanya perbedaan antara kedua variabel.

G. Etika Penelitian

Etika merupakan ilmu yang mempelajari terkait adat, kebiasaan, dan nilai-nilai yang berlaku dalam kehidupan masyarakat. Tiap-tiap penelitian harus dijalankan

dengan mematuhi prinsip-prinsip etika penelitian. Dalam studi ini, prinsip etika yang diterapkan adalah *beneficence* dan *non-maleficence*, yakni prinsip untuk berbuat kebaikan dengan memberikan manfaat sebesar-besarnya serta meminimalkan risiko yang mungkin timbul bagi orang lain (Haryani dan Setiyobroto, 2022)