

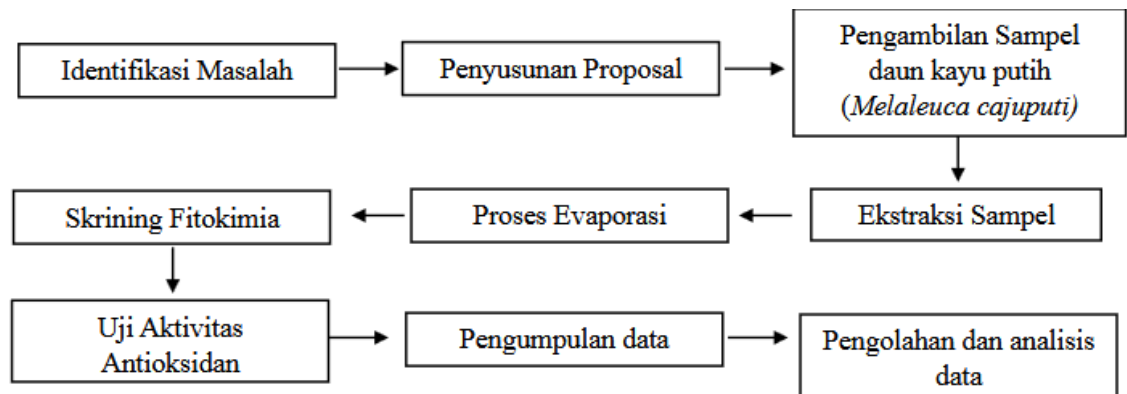
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dan menggunakan desain quasi eksperimen. *Quasi eksperimen* merupakan metode penelitian yang menguji pengaruh perlakuan tertentu dalam kondisi terkendali, di mana pemilihan subjek sampel tidak dilakukan secara acak (Nurjannah et al., 2019). Peneliti memilih desain ini karena penelitian ini memiliki kelompok kontrol, tetapi tidak dapat sepenuhnya mengendalikan variabel eksternal yang memengaruhi pelaksanaan eksperimen.

B. Alur Penelitian



Gambar 4 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Sampel daun kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) berasal dari kelurahan Baler Bale Agung, Jembrana, Negara, Bali. Pemeriksaan skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dilakukan di laboratorium pertanian Universitas Warmadewa.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret tahun 2025 sampai dengan April Tahun 2025.

D. Sampel Penelitian dan Unit Analisis

1. Sampel penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) muda dan tua yang diperoleh dari kelurahan Baler Bale Agung, Jembrana, Negara, Bali sebanyak 2 kg.

2. Unit analisis

Unit Analisis merupakan suatu yang akan diteliti untuk mengumpulkan data dan menganalisis perbedaan antara unit-unit analisis yang berbeda (Sebastian dan Pramono, 2021). Unit analisis dalam penelitian ini yaitu kandungan aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% daun muda dan daun tua tanaman kayu putih (*Melaleuca cajuputi*)

3. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yaitu *purposive sampling*, merupakan Teknik pengambilan sampel didasarkan pada kriteria tertentu (Subhaktiyasa, 2024). Adapun kriteria sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu:



Sumber: (Dokumentasi Pribadi)
Gambar 5 Sampel Daun Kayu Putih Muda dan Tua

- a. Kriteria inklusi dari daun kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) muda yang digunakan adalah daun berwarna hijau muda, memiliki bulu halus pada permukaan daun, terletak pada bagian pucuk hingga daun ke-4. Sedangkan daun kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) tua yang digunakan adalah daun berwarna hijau tua, tidak memiliki bulu halus pada permukaan daun, terletak pada urutan daun ke-5 hingga ke-8 (Dawiansyah dkk., 2022).
- b. Kriteria eksklusi, yaitu daun layu, berwarna kuning, berjamur dan berlubang.

4. Jumlah dan besaran sampel

a) Jumlah sampel

Jumlah sampel daun kayu putih muda dan tua yang digunakan sebanyak 2 kg sampel mentah dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Kemudian dimaserasi dengan pelarut tertentu dan digunakan hasil pengeringan serbuk simplisia daun kayu putih muda dan tua yang telah kering. Kemudian, direndam dalam pelarut etanol 70%.

b) Besaran sampel

Pada penelitian menggunakan dua perlakuan yaitu ekstrak daun muda dan daun tua tanaman kayu putih (*Melaleuca cajuputi*). Sehingga jumlah total perlakuan yang dilakukan adalah dua perlakuan. Pada masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan yang ditentukan oleh rumus *Federer* (Mulih dan Rosyidah, 2020)

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

r = Jumlah pengulangan

t = Jumlah perlakuan

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(2-1)(r-1) \geq 15$$

$$1(r-1) \geq 15$$

$$1r - 1 \geq 15$$

$$r \geq 15 + 1$$

$$r \geq 16$$

Berdasarkan perhitungan diatas, pengulangan yang dilakukan terhadap setiap perlakuan sampel sebanyak 16 kali pengulangan.

5. Alat dan bahan

a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari berbagai alat antara lain: timbangan bangku, gunting, keranjang buah, saringan, blender, neraca analitik, gelas, gelas kimia (Pyrex), labu ukur (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), corong, pipet volume (Pyrex), pipet ukur, pipet bola, batang pengaduk, tabung reaksi beserta rak, hot plate, seperangkat rotary evaporator, dan seperangkat spektrofotometer UV-visibel.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: daun kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) muda dan tua, etanol 70%, aluminium foil, kertas saring, aquadest, asam sulfat (H_2SO_4) pekat, kloroform, serbuk magnesium (Mg), asam klorida (HCl) pekat, asam asetat anhidrat, besi (III) klorida ($FeCl_3$) 5%, reagen Dragendorff, dan serbuk DPPH.

6. Prosedur kerja

a. Pra-analitik

1) Pengambilan dan pembuatan serbuk simplisia

Sampel daun kayu putih, baik yang muda maupun tua, diambil masing-masing sebanyak 2 kg. Daun yang telah diperoleh kemudian disortir sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan. Selanjutnya, daun dicuci bersih, ditiriskan, dicacah, dan ditimbang untuk menentukan berat daun segar. Proses pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan sampai daun benar-benar kering. Setelah kering, daun kayu putih disortir kembali untuk memisahkan sampel dari bahan atau kotoran lain yang mungkin terkandung selama proses pengeringan. Daun kering kemudian digiling dengan blender dan ditimbang kembali untuk mengetahui berat keringnya. Pengayakan dilakukan untuk memperoleh simplisia kering dengan ukuran butir seragam.

2) Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan pada daun muda dan tua kayu putih, dengan perbandingan 1:4 sehingga serbuk simplisia sebanyak 250 gram dimasukkan ke dalam toples, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL, atau hingga semua serbuk terendam (Putri dkk., 2024). Direndam selama 2 hari. Setelah itu, dilakukan penyaringan filtrat. Selama 2 hari dilakukan kembali proses maserasi yang sama. Setelah 2 hari, etanol dan ampas daun kayu putih disaring lagi. Proses ini diulang dan disimpan selama 3 hari (Dewi et al., 2024). Setelah tiga hari penyimpanan, filtrat diuapkan dalam bak air yang diatur pada 50°C menggunakan evaporator rotari hingga menghasilkan ekstrak yang kental. Menimbang ekstrak

kental memungkinkan kita untuk menghitung hasilnya (Senduk et al., 2020). Rendemen merupakan perbandingan ekstrak yang diperoleh dengan ekstrak awal.

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

Remaserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 70%, yang dipilih karena etanol memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 79°C, maka lebih sedikit panas yang dibutuhkan selama proses pemekatan. Selain itu, etanol merupakan pelarut yang aman untuk dikonsumsi karena toksisitasnya jauh lebih rendah dibandingkan pelarut lainnya dan karenanya tidak bersifat toksik.(Hasanah dan Novian, 2020).

b. Analitik

1) Skrining fitokimia

a) Preparasi sampel

Ditimbang masing-masing 0,01 gr pada daun kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) muda dan tua lalu tambahkan dengan 10 ml etanol 70% homogenkan dengan cara diaduk, setelah itu disaring. Sehingga diperoleh filtrat yang siap digunakan.

b) Pembuatan blanko

Prosedur pengujian blanko memiliki prilaku sama pada saat pengujian sampel hanya saja pada pengujian blanko sampel digantikan dengan etanol 70%. Pengujian ini berfungsi sebagai pebanding sehingga memberikan Gambaran hasil positif dan negative yang jelas.

c) Flavonoid

Pipet 1 ml sampel ekstrak bahan alam, lalu tambahkan NaOH 2%, dan beberapa tetes HCl pekat, lalu kocok campuran dan amati perubahan yang terjadi,

akan terbentuk warna kuning atau jingga jika menunjukkan hasil positif (Ayuni, 2020).

d) Fenol

Pipet 1 mL sampel ekstrak bahan alam, lalu tambahkan 3-4 tetes larutan FeCl_3 5%, lalu kocok campur dan amati perubahan yang terjadi, akan terbentuk warna hijau biru yang kuat jika menunjukan hasil positif (Manongko dkk., 2020).

e) Terpenoid

Pipet 1 ml sampel ekstrak bahan alam, kemudian tambahkan 2 ml kloroform, dan tambahkan 5 H_2SO_4 melalui dinding tabung, amati perubahan yang terjadi, akan terbentuk warna coklat kemerah hasil positif (Kusumo dkk., 2022)

f) Alkaloid

Pipet 1 ml sampel ekstrak bahan alam, lalu ditambahkan 3-5 tetes pereaksi dragendorff pada dinding tabung. Amati perubahan yang terjadi akan terbentuk endapan merah jingga yang menunjukan hasil positif (Izzah dkk., 2020).

g) Tanin

Pipet sebanyak 1 ml sampel ditambahkan sebanyak 2-3 tetes FeCl_3 . Amati Perubahan warna yang terjadi jika sampel positif memiliki senyawa tanin akan terbentuk warna orange.

h) Steroid

Pipet sebanyak 1 ml sampel tambahkan sebanyak 5 tetes asam asetat. Amati perubahan warna jika sampel mengandung senyawa steroid menghasilkan warna kehijauan.

i) Saponin

Ekstrak etanol 70% daun muda dan tua tanaman kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) pipet masing-masing sebanyak 1 ml, lalu tambahkan 10 ml air panas dan kocok kuat-kuat selama 10 detik, amati busa yang muncul selama 5 menit, kemudian tambahkan 1 tetes HCl 2N, amati perubahan yang terjadi, keberadaan saponin dilihat dari busa yang terbentuk secara stabil selama 30 detik dengan ketinggian 1 cm hingga 3 cm (Khafid dkk., 2023).

2) Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada dua sampel daun muda dan daun tua pada tanaman kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) dengan menggunakan pelarut etanol 70% , dengan prosedur serta perlakuan yang sama.

a) Pembuatan larutan DPPH

Timbang sebanyak 4 mg serbuk DPPH masukkan kedalam labu ukur 100 ml kemudian tambahkan dengan metanol p.a hingga tanda batas. Sehingga diperoleh konsentrasi 40 ppm, Letakan pada botol gelap (Tikulembang dkk., 2023).

b) Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan metanol p.a sebanyak 2 mL. tutup dengan aluminium foil, homogenkan lalu diinkubasi selama 30 menit pada ruangan gelap. Selanjutnya, serapan larutan blanko diukur pada panjang gelombang maksimum yaitu 517 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Nathania dkk., 2020).

c) Pembuatan larutan stok

Berat sampel ditimbang 100 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan dengan metanol p.a ditambahkan sampai tanda batas

sehingga diperoleh 1000 ppm (larutan induk). Dilakukan pengenceran dengan masing-masing konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran yaitu, $M_1.V_1 = M_2.V_2$. Pada keenam konsentrasi masing-masing hasil yang di dapat dari hasil V1. Masing-masing ekstrak dipipet sebanyak 50, 100, 150, 200, 250 dan 300 μ l dipipet pada labu ukur 10 mL lalu diencerkan dengan etanol p.a hingga tanda batas (Moniung dkk., 2022).

d) Pengukuran sampel ekstrak bahan alam

Berat sampel ditimbang 100 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan dengan methanol sampai tanda batas hingga diperoleh konsentrasi sampel 1000 ppm (larutan induk), Larutan induk yang diperoleh dilakukan pengenceran bertingkat sehingga mendapatkan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm. Masing-masing 2 ml larutan dipipet dipindahkan pada tabung reaksi, dan tambahkan 2 ml larutan DPPH, diinkubasi pada ruangan gelap selama 30 menit. Ukur absorbansi sampel pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (517 nm) pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali. Lakukan pengukuran pada blanko dengan prosedur dan perlakuan yang sama, hanya saja saat penambahan larutan sampel diganti dengan larutan DPPH (Kiromah dkk., 2021).

c. Post-analitik

a) Perhitungan persen inhibisi

Pengujian antioksidan dilakukan dengan menghitung persentase penghambatan radikal bebas (persen inhibisi) yang diperoleh dari data absorbansi dihitung dengan cara (Moniung dkk., 2022):

$$\%inhibisi = \frac{absorbansi\ blanko - absorbansi\ sampel}{absorbansi\ blanko} \times 100\%$$

b) Penentuan IC₅₀

Setelah didapatkan data persen aktivitas antioksidan, kemudian dilakukan perhitungan nilai IC₅₀ dengan menggunakan persamaan regresi linier $y = bx + a$. Nilai IC₅₀ dapat ditentukan secara grafik menggunakan kurva kalibrasi dengan memplotkan konsentrasi ekstrak dengan persen inhibisi. Dimana nilai y digantikan dengan 50.

Secara khusus, suatu senyawa diklasifikasikan sebagai antioksidan sangat kuat jika memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, sangat kuat jika nilai IC₅₀ berada di antara 50-100 ppm, kuat jika IC₅₀ berada pada kisaran 101-150 ppm dikategorikan sedang, dan 150-200 ppm dikategorikan lemah jika nilai IC₅₀ berada di kisaran > 200 ppm dikategorikan sangat lemah (Fatmawati dkk., 2023).

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

Perhitungan *Antioxidant Activity Index* (AAI) diperoleh dengan rumus (Sawiji dan Jawa, 2021).:

$$Nilai\ AAI = \frac{Konsentrasi\ DPPH\ (\mu g/mL)}{IC50\ (\mu g/mL)}$$

Antioxidant Activity Index (AAI) adalah metode untuk menstandarisasi hasil uji antioksidan berdasarkan pendekatan DPPH. Nilai AAI ini berfungsi untuk mengelompokkan tingkat kekuatan antioksidan. Jika nilai AAI kurang dari 0,05, antioksidan dikategorikan lemah. Jika nilai AAI sama dengan atau lebih dari 0,05, antioksidan diklasifikasikan sedang. Untuk nilai AAI lebih dari 1 hingga 2, sifat antioksidan dianggap kuat, sementara jika AAI lebih dari 2, maka antioksidan diklasifikasikan sebagai sangat kuat (Segara dan Kurniawan, 2023)

d) Pengolahan limbah

Pengolahan limbah pada penelitian ini dilakukan dengan cara pertama gunakan alat pelindung diri seperti masker, sarung tangan medis, dan jas laboratorium selanjutnya limbah cair berupa pelarut organik, bahan kimia hasil penelitian ditampung pada jerigen yang tertutup. Limbah yang bersifat asam dinetralkan dengan basa seperti: CaO , sebaliknya limbah yang bersifat basa dinetralkan dengan asam seperti: H_2SO_4 atau HCl , air sisa yang digunakan dalam pencucian alat-alat laboratorium dapat langsung dibuang kedalam bak saluran air dengan cara dialiri air. Pembuangan limbah bahan kimia cair diencerkan terlebih dahulu sampai pH netral yang berkisaran pH 7 (Sulistiyanti dkk., 2018)

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data yang dikumpulkan secara langsung peneliti disebut data primer. Data yang dikumpulkan melalui hasil uji kuantitatif dan kualitatif yang menguji fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak daun kayu putih.

b. Data sekunder

Data sekunder diperoleh 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

Metode pengumpulan data dalam penelitian ini meliputi observasi dan analisis laboratorium. Observasi dilakukan melalui pengamatan langsung dan pencatatan terkait bahan alam yang akan diteliti. Sementara itu, analisis

laboratorium digunakan untuk memperoleh data dari uji skrining fitokimia dan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun kayu putih muda dan tua.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen merupakan suatu alat yang digunakan dalam membantu peneliti dalam proses pengumpulan data. Pendekatan penelitian dan kualitas alat ukur memiliki hubungan erat, di mana hasil penelitian sangat bergantung pada ketepatan instrumen yang digunakan. Data yang dikumpulkan menjadi elemen kunci yang mempengaruhi kualitas keseluruhan penelitian. Instrumen pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Alat tulis
- b. Kamera
- c. Alat laboratorium yang digunakan untuk skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Teknik pengolahan data pada skripsi ini dilakukan dengan cara data yang diperoleh dicatat, diolah, dan disajikan dalam bentuk narasi serta table. Pengolahan data dari skrining fitokimia dilakukan menggunakan analisis deskriptif untuk menjelaskan kandungan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, fenol, tannin, terpenoid yang terdapat dalam ekstrak etanol daun kayu putih muda dan tua. Hasil tersebut disajikan dalam bentuk Tabel untuk memberikan Gambaran yang jelas.

Pada pengolahan data aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH melibatkan perhitungan persentase inhibisi (% inhibisi) dalam menentukan nilai

IC₅₀. Dari data % inhibisi pada setiap ekstrak dibuat kurva standar dimana sumbu X sebagai konsentrasi sampel dan sumbu Y merupakan % inhibisi. Sehingga diperoleh persamaan regresi linear $Y = bx + a$ untuk menentukan nilai IC₅₀. Selanjutnya, hasil nilai IC₅₀ digunakan untuk menggolongkan sifat antioksidan ekstrak berdasarkan kategori Antioxidant Activity Index (AAI).

2. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan bantuan software computer, data yang dikumpulkan kemudian dianalisis.

a. Uji normalitas

Uji normalitas dilakukan menggunakan metode *Shapiro-Wilk Test*. Uji ini dilakukan untuk mengetahui sebaran data acak suatu sampel yang digunakan dalam penelitian yang tidak lebih dari 50 sampel. Penentuan distribusi data didasarkan pada tingkat signifikansi sebesar 0,05, di mana data dianggap berdistribusi normal jika nilai signifikansi > 0,05.

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan menggunakan uji *Levene's Test* untuk mengetahui apakah sampel memiliki varian yang sama. Uji ini dilakukan sebagai syarat dalam analisis *independent sample t test*. Uji homogenitas dapat dilakukan apabila kelompok data berdistribusi normal. Penentuan distribusi data pada Tingkat signifikansi sebesar 0,05 dimana data dianggap homogen jika nilai signifikansi > 0.05

c. Uji hipotesis

Uji hipotesis dilakukan menggunakan *Independent Sample T-Test*. Uji ini dilakukan untuk membandingkan rata-rata antara dua sampel bebas yang tidak

berhubungan satu dengan yang lain. Jika data berdistribusi normal. Uji ini digunakan untuk mengetahui perbedaan signifikan aktivitas antioksidan antara ekstrak daun muda dan daun tua kayu putih (*Melaleuca cajuputi*). Jika $p\text{-value} \leq 0,05$ menunjukkan ada perbedaan signifikan antara aktivitas antioksidan daun muda dan daun tua. Sedangkan jika $p\text{-value} > 0,05$ menandakan tidak ada perbedaan signifikan antara ekstrak daun muda dan daun tua. Apabila data tidak berdistribusi normal, analisis dapat menggunakan uji *Mann-Whitney*.

d. Uji statistik *Mann-Whitney*

Uji Mann-Whitney merupakan uji yang cocok untuk dua kelompok independen dengan distribusi non-normal. Penarikan kesimpulan dilakukan berdasarkan tingkat signifikansi, di mana nilai signifikansi $< 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada aktivitas antioksidan antara dua kelompok yang diuji.

G. Etika Penelitian

Secara etimologi, kata "etika" berasal dari bahasa Yunani *ethos*, yang berarti kebiasaan, adat, watak, atau cara berpikir. Dalam bentuk jamak, *ta etha* mengacu pada adat kebiasaan. Istilah ini kemudian digunakan oleh Aristoteles, filsuf Yunani besar, untuk merujuk pada filsafat moral. Dengan demikian, etika diartikan sebagai ilmu tentang kebiasaan atau adat yang biasa dilakukan. Etika penelitian yang diterapkan pada penelitian ini adalah *beneficence* dan *non maleficence*, yaitu prinsip berbuat baik, memberikan manfaat yang maksimal dan risiko yang minimal (Haryani dan Setyobroto, 2022).