

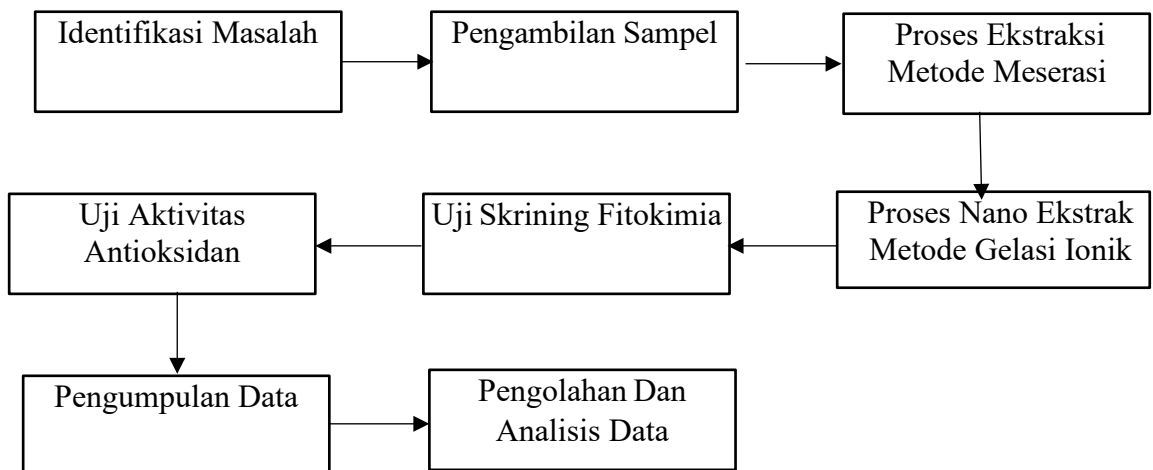
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah deskriptif. Pengujian fitokimia dan aktivitas antioksidan nano ekstrak akuades akar beluntas dilakukan dengan metode kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengumpulkan data tentang skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan nano ekstrak akuades akar beluntas.

B. Alur Penelitian



Gambar 3 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat pengambilan sampel di Desa Sumberkima, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali. Pemeriksaan Sampel dilakukan di Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Kesehatan Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2025 sampai bulan April 2025

D. Sampel penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini diperoleh akar tanaman beluntas, tempat pengambilan sampel di Desa Sumberkima, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali

2. Kriteria sampel

akar yang segar, tidak busuk, tidak ada hama menempel di sekitar bagian akar, tidak kering, dan tidak berlubang.



Sumber : Dokumentasi pribadi

Gambar 4 Akar Tanaman Beluntas (*Pluchea indica L.*)

3. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan yang dinyatakan dengan nilai AAI dari nano ekstrak akar beluntas

4. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan proses untuk mendapatkan sampel yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi dua tahap. Tahap yang

pertama adalah proses ekstraksi dengan metode maserasi. Dan tahap yang kedua metode yang digunakan adalah metode deksriptif sintesis nano ekstrak, proses ini dilakukan untuk memperkecil ekstrak menjadi nano ekstrak, metode yang digunakan adalah gelas ionik. Jenis Dan Teknik Pengambilan Sampel

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer adalah salah satu dari berbagai jenis data yang dikumpulkan dalam penelitian ini. Data primer meliputi kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidan nano ekstrak akuades akar beluntas.

b. Data sekunder

Data dari jurnal dan penelitian sebelumnya, bersama dengan data pendukung lainnya, digunakan sebagai data sekunder dalam penelitian ini.

2. Teknik pengumpulan data

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

3. Alat dan bahan

a. Alat

Alat-alat yang diperlukan pada percobaan ini adalah pipet ukur 50 mL pipet volume 1 mL, 2 mL, 5 mL, pipet tetes, bulb pipet, gelas ukur 50 mL, batang pengaduk, spatula, 2 *magnetic stirrer*, ayakan 40 mesh, nampan, beaker gelas 250 mL, erlenmayer 250 mL, tabung reaksi, *vortex mixer*, blender, hot plate, rak tabung reaksi labu takar, evaporator, neraca analitik, oven, kuvet, dan spektrofotometer Uv-Vis, botol kaca gelap.

b. Bahan

Bahan yang dipakai saat penelitian yaitu akar beluntas, pereaksi *dragendroff*, NaOH 10% , etanol 96% , bubuk kitosan, serbuk *DPPH (1,1- diphenyl 1-2 picrylhydrazil)*, kertas saring, tisu dan alumunium foil, akuades, bubuk Na-TPP, H₂SO₄ pekat, FeCl₃ 5 %, dan asam asetat glasial 1%.

4. Prosedur penelitian

a. Ekstraksi

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

1. Akar beluntas dicuci dengan air mengalir
2. Akar beluntas dilayukan tanpa terkena sinar matahari
3. Menghaluskan akar beluntas dengan blender
4. Mengayakan serbuk agar mendapatkan bubuk yang halus
5. Menyimpan serbuk simplisia pada toples tertutup dan kedap udara pada suhu ruang untuk digunakan lebih lanjut.
6. Merendam serbuk simplisia sebanyak 150 gram dengan 750 ml akuades pada wadah tertutup dan dibiarkan selama 24 jam.
7. Menyaring dan memisahkan filtrat, kemudian filtrat akar beluntas disimpan dalam botol kaca gelap.
8. Residu (ampas) ditambahkan 750 ml akuades lalu ditutup dan biarkan selama 24 jam. Ulangi proses perendaman hingga 2 kali.
9. Hasil maserat kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 45°C, hingga dihasilkan ekstrak kental.

10. Menimbang ekstrak pekat yang di peroleh.
11. Menghitung persentase rendemen hasil ekstraksi dengan persamaan :

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

b. Nano ekstrak :

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

1. Pembuatan polimer kitosan konsentrasi 0,2%
2. Menimbang serbuk kitosan pada neraca analitik sebanyak 0,2 g.
3. Melarutkan 0,2 g kitosan dengan 100 mL asam asetat glasial 1%.
4. Pembuatan larutan Na-TPP konsentrasi 0,1%.
5. Menimbang bubuk Na-TPP pada neraca analitik sebanyak 0,1 g.
6. Melarutkan serbuk Na-TPP sebanyak 0,1 g dengan 100 mL akuades.
7. Menimbang ekstrak kental akar beluntas sebanyak 1g.
8. Menambahkan larutan etanol p.a sebanyak 35 mL
9. Menambahkan 15 mL akuades.
10. Menambahkan kitosan 50 mL 0,2%
11. Ditambahkan secara bertahap dengan Na-TPP 0,1% sebanyak 10 mL sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* kecepatan 400 rpm selama 20 menit.
12. Dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit
13. Mengukur % transmitansi larutan nano ekstrak secara spektrofotometri di panjang gelombang 650 nm.
14. Mencatat hasil % transmitansi yang didapatkan.

c. Skrining fitokimia :

Dalam skrining fitokimia pada penelitian ini merujuk pada (Shaikh & Patil, 2020):

1. Uji alkaloid

Pipet 1mL sampel nano ekstrak akuades akar beluntas, tambahkan 1mL Reagen *Dragendroff's*, homogenkan hasil positif jika terbentuk endapan merah-coklat

2. Uji flavonoid

1 mL sampel nano ekstrak akar beluntas, tambahkan 3-5 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif akan terbentuk warna jingga

3. Uji saponin

Tambahkan 0,5 mL sampel nano ekstrak akuades akar beluntas dengan 2 ml akuades, kocok hingga terbentuk busa hasil positif jika terbentuk busa yang stabil selama 10 menit.

4. Uji tanin

Dimasukkan 0,5 mL nano ekstrak akuades daun beluntas, kemudian ditambahkan 5mL larutan NaOH 10%. Hasil positif jika terbentuk emulsi

5. Uji fenol

Dimasukkan 1 mL nano ekstrak akuades daun beluntas, kemudian ditambahkan 3-5 tetes larutan $FeCl_3$ 5%. Hasil positif jika berwarna hijau kehitaman

d. Uji antioksidan :

Dalam uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini merujuk pada Monangin dkk., 2024 :

1. Pembuatan Larutan Induk

Pembuatan larutan induk 500 ppm dilakukan dengan melarutkan 0,5 mL nano ekstrak akar beluntas kedalam 10 mL akuades dalam labu ukur lalu divortex hingga homogen, kemudian dilakukan pengenceran menjadi 5 seri konsentrasi yakni 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm dihitung menggunakan rumus pengenceran : $V1 \times M1 = V2 \times M2$, masing-masing konsentrasi dimasukan ke dalam labu takar 10 ml.

2. Pembuatan Larutan DPPH 40 ppm

Timbang 4 mg DPPH digunakan untuk membuat larutan DPPH, yang kemudian dilarutkan dalam 100 mL metanol dalam tabung reaksi dan kemudian divortex. Larutan didiamkan selama 30 menit dan kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat dan ditutup dengan alumunium foil.

3. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Menguji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan dengan mencampur 2 ml larutan DPPH dengan 2 ml larutan sampel nano ekstrak akuades akar beluntas yang terdiri dari 5 seri konsentrasi, yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Larutan kemudian diputar dan diinkubasi selama 30 menit di suhu ruangan 37° C pada masing-masing konsentrasi sampel pengujian aktivitas antioksidan dilakukan 3 kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi sampel.

4. Analisis data

Setelah masing-masing sampel di inkubasi bersama larutan DPPH, perubahan warna diamati untuk menilai aktivitas antioksidan. Ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm untuk mengukur absorbansi larutan.

5. Perhitungan persentase inhibisi dan nilai IC₅₀

Nilai (*Inhibitory Concetration*) IC₅₀ adalah parameter yang biasa digunakan untuk menggambarkan hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Nilai IC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH. Nilai IC₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

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

Setelah diperoleh % inhibisi masing masing konsentrasi sampel hasil perhitungan dibuat dalam suatu persamaan linier $y = a + bx$, hasil dari persamaan linier digunakan untuk memperoleh nilai IC₅₀. Rumus untuk menghitung nilai IC₅₀ adalah $50 = a + bx$

6. *Antioxidant Activity Index* (AAI)

Penilaian AAI digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan Untuk mengetahui nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*) menggunakan rumus :

$$AAI = \frac{\text{Konsentrasi DPPH (ppm)}}{\text{Konsentrasi IC50 (ppm)}}$$

E. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Hasil skrining fitokimia diproses menggunakan metode analisis deskriptif,

kualitatif yang menguraikan senyawa metabolit seperti alkaloid, saponin, flavonoid, fenol, dan tanin yang dapat ditemukan dalam nano ekstrak akuades akar tanaman beluntas. Sementara itu, pengolahan data untuk mengukur aktivitas antioksidan nano ekstrak akudes akar beluntas dengan metode DPPH dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

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

Setelah diperoleh % inhibisi masing-masing konsentrasi sampel hasil perhitungan dibuat dalam suatu persamaan linier $y = a + bx$, hasil dari persamaan linier digunakan untuk memperoleh nilai IC_{50} . Rumus untuk menghitung nilai IC_{50} adalah $50 = a + bx$.

Untuk mengetahui nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*) menggunakan rumus :

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

2. Analisis data

Analisis data pada hasil skrining fitokimia dianalisis secara deskriptif kualitatif dengan menjelaskan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada nano ekstrak akuades akar beluntas. Sedangkan kandungan aktivitas antioksidan yang terdapat pada nano ekstrak akuades akar beluntas disajikan dalam bentuk deskriptif kuantitatif dan penentuan aktivitas antioksidan yang diperoleh dihitung menggunakan rumus persamaan linier.