

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen semu (*quasi experiment*) yaitu untuk mengevaluasi perbedaan dari tiga jenis pelarut, yaitu etanol 70%, akuades, dan etil asetat terhadap kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dalam ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn). Karena pada situasi penelitian ini tidak memungkinkan untuk membentuk kelompok kontrol yang sebanding, karena seluruh sampel berasal dari bahan yang sama dan perlakuan hanya dibedakan berdasarkan jenis pelarut ekstraksi (Sugiyono, 2023).

Desain penelitian yang digunakan adalah *one-group posttest only*, yaitu pengukuran kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dilakukan setelah ekstraksi menggunakan masing-masing pelarut, sehingga memberikan gambaran tentang potensi efek pelarut terhadap sifat-sifat antioksidan dan senyawa flavonoid dari tanaman yang diteliti. Rancangan *one-group posttest only* pada penelitian ini yaitu:

Tabel 4
Desain Penelitian *One-group Posttest Only*

Perlakuan	Post-test
X ₁	O ₁
X ₂	O ₂
X ₃	O ₃

Sumber: (Adiputra dkk., 2021)

Keterangan:

X₁ = Ekstraksi dengan etanol 70%

X₂ = Ekstraksi dengan akuades

X₃ = Ekstraksi dengan etil asetat

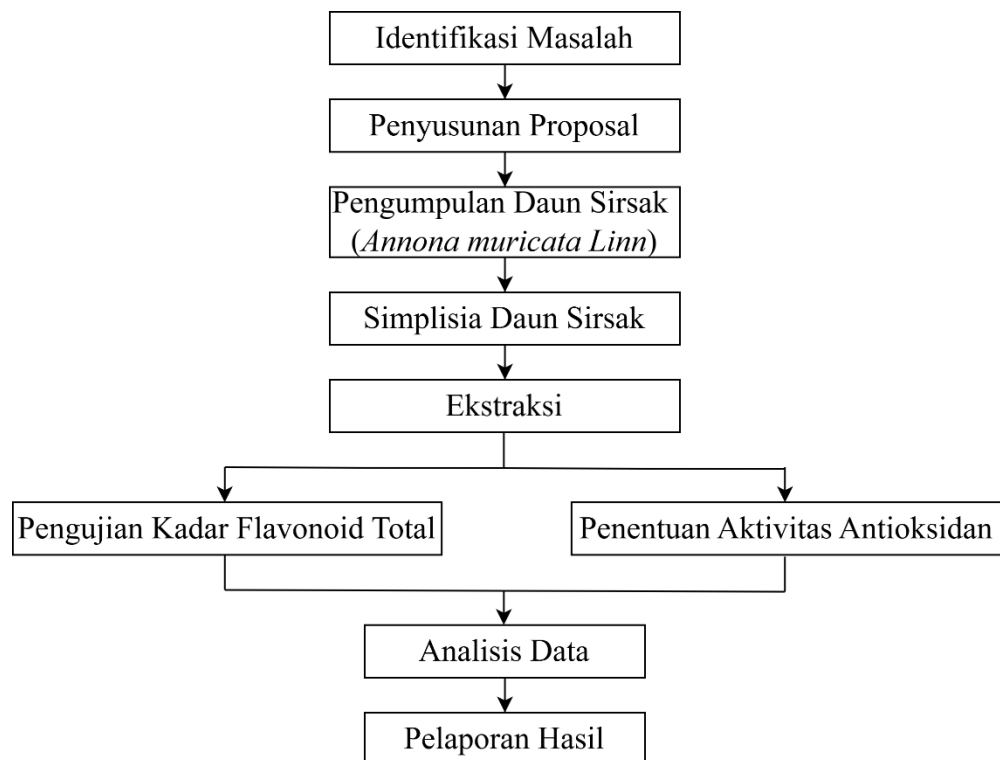
O₁ = Kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan

O₂ = Kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan

O₃ = Kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan

B. Alur Penelitian

Alur penelitian dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat Dinas Kesehatan Provinsi Bali untuk proses pembuatan simplisia, maserasi, evaporasi dan di Laboratorium Kimia Dasar dan Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Denpasar untuk uji kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Oktober 2025 sampai dengan bulan April 2026, melalui tahapan pembuatan proposal hingga penyusunan skripsi.

D. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) pada berbagai jenis pelarut, yaitu etanol 70%, akuades, dan etil asetat. Bahan uji daun sirsak yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Br. Tanggungtiti, Desa Tangguntiti, Kecamatan Selemadeg Timur, Kabupaten Tabanan, Bali. Teknik pengambilan sampel dilakukan berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1. Kriteria inklusi

- a. Daun sirsak diambil dari lokasi yang sama
- b. Lembaran daun yang utuh
- c. Daun yang digunakan merupakan daun ke-3 sampai ke-5 dari pucuk cabang

2. Kriteria eksklusi

- a. Daun berjamur, ditandai dengan adanya bercak putih atau abu atau hitam, dan permukaan daun berbulu
- b. Berwarna kuning atau kecokelatan
- c. Terdapat hama di sekeliling daun, seperti telur atau serangga yang menempel

Besar sampel daun sirsak yang digunakan 6 kg sampel mentah dan digunakan sebanyak 2000 gram serbuk simplisia daun sirsak (*Annona muricata* Linn) yang telah kering dan diserbukkan. Kemudian, direndam dalam pelarut etanol 70%, akuades, dan etil asetat masing-masing sebanyak 400 gram serbuk simplisia.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Data dalam pelaksanaan penelitian ini, dua jenis data yang digunakan adalah data primer dan data sekunder.

- a. Data primer merupakan hasil pengukuran kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn).
- b. Data sekunder yaitu informasi yang diperoleh dari sumber-sumber literatur ilmiah sebelumnya. Data tersebut bisa berupa laporan-laporan dinas kesehatan, riset kesehatan, maupun jurnal penelitian orang lain dan buku.

2. Teknik pengumpulan data

Pada penelitian ini, sampel daun sirsak dipilih menggunakan teknik purposive sampling yaitu dengan memilih sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Pengumpulan data untuk menentukan kadar flavonoid total dilakukan melalui metode Aluminium Klorida ($AlCl_3$) dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Sementara itu, pengumpulan data untuk mengukur aktivitas antioksidan

dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) juga melalui spektrofotometri UV-Vis.

F. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun sirsak dalam penelitian ini antara lain gelas ukur, labu ukur, corong gelas, batang pengaduk, pipet tetes, gelas erlenmeyer, *beaker glass*, pipet volume, timbangan analitik, oven, blender, *rotary evaporator*, dan ayakan.

Alat yang digunakan untuk menganalisis kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak dalam penelitian ini adalah spektrofotometri UV-Vis, neraca digital analitik, *beaker glass*, labu ukur, corong gelas, batang pengaduk, pipet tetes, gelas erlenmeyer, pipet volume, *pipette bulb*, spatula.

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun sirsak dalam penelitian ini adalah daun sirsak, aluminium foil, kertas saring, etanol 70%, akuades, dan etil asetat.

Bahan yang digunakan untuk menganalisis kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak dalam penelitian ini adalah sampel ekstrak bahan alam, reagen kuersetin, etanol 96%, AlCl_3 , CH_3COOK , akuades. Sementara bahan analisis aktivitas antioksidan adalah sampel ekstrak bahan alam, DPPH, aluminium foil, dan metanol.

3. Prosedur kerja

a. Pra analitik

- 1) Pengambilan, pengolahan sampel daun sirsak, dan pembuatan simplisia
 - a) Langkah awal, daun sirsak segar dipilah sesuai dengan kriteria yang telah ditentukan.
 - b) Selanjutnya, daun dicuci bersih dengan air mengalir, lalu ditiriskan hingga airnya berkurang.
 - c) Daun yang masih segar kemudian dipotong-potong dan ditimbang untuk mengetahui berat awalnya.
 - d) Proses pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan selama ± 1 bulan.
 - e) Setelah benar-benar kering, daun sirsak dihaluskan menggunakan blender hingga berubah menjadi serbuk.
 - f) Serbuk ini kemudian diayak dengan ayakan berukuran 60 mesh agar diperoleh partikel yang halus dan seragam, yang dikenal sebagai simplisia daun sirsak.
 - g) Simplisia tersebut disimpan dalam wadah tertutup untuk menjaga kualitasnya.

2) Ekstraksi

- a) Sebanyak 400 gram serbuk simplisia daun sirsak ditempatkan ke dalam wadah-wadah terpisah.
- b) Kemudian serbuk diekstraksi menggunakan tiga jenis pelarut berbeda, yaitu etanol 70%, akuades, dan etil asetat masing-masing sebanyak 2000 ml, sehingga perbandingan antara serbuk simplisia dan pelarut adalah 1:5.
- c) Masing-masing wadah ditutup rapat dengan aluminium foil dan didiamkan selama tiga hari pada suhu ruang dengan pengadukan rutin setiap 8 jam sekali

(dilakuan 2 kali sehari). Setelah 3 hari, ekstrak yang terbentuk disaring untuk memisahkan cairan dari ampasnya.

- d) Ampas yang tersisa kemudian dimaserasi kembali (remaserasi) sebanyak tiga kali dengan metode dan pelarut yang sama untuk memastikan kandungan senyawa terekstraksi secara maksimal.
- e) Seluruh filtrat atau cairan hasil penyaringan digabungkan, lalu dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* vakum hingga diperoleh ekstrak kental.
- f) Ekstrak kental ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup sebelum digunakan untuk pengujian.
- g) Diperoleh rendeman ekstrak dengan membandingkan antara massa ekstrak pekat yang diperoleh dengan massa simplisia yang digunakan, menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendeman} = \frac{\text{Bobot ekstrak (gram)}}{\text{Bobot simplisia (gram)}} \times 100$$

b. Analitik

1) Pengukuran kadar flavonoid total

a) Pembuatan larutan AlCl_3

- (1) Timbang AlCl_3 sebanyak 2,5 gram.
- (2) Larutkan dengan akuades secukupnya hingga larut.
- (3) Masukkan larutan ke dalam labu ukur 25 ml.
- (4) Tambahkan akuades hingga mencapai tanda batas, kemudian homogenkan.

b) Pembuatan larutan CH_3COOK

- (1) Pipet larutan CH_3COOK sebanyak 5 ml.
- (2) Masukkan ke dalam labu ukur 25 ml.

(3) Tambahkan akuades hingga mencapai tanda batas, kemudian homogenkan larutan.

c) Pembuatan larutan induk quercetin 100 ppm

(1) Timbang 2,5 mg serbuk quercetin.

(2) Larutkan dengan etanol 96% secukupnya hingga larut.

(3) Masukkan larutan ke dalam labu ukur 25 ml.

(4) Tambahkan etanol 96% hingga mencapai tanda batas, kemudian homogenkan.

d) Pembuatan larutan induk sampel 10.000 ppm

(1) Timbang 250 mg sampel.

(2) Larutkan dengan akuades secukupnya hingga larut.

(3) Masukkan larutan ke dalam labu ukur 25 ml.

(4) Tambahkan akuades hingga mencapai tanda batas, kemudian homogenkan.

e) Pembuatan kurva standar quercetin

(1) Buat deret konsentrasi larutan standar quercetin dengan konsentrasi 0,4 ppm, 0,6 ppm, 0,8 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dengan cara mengencerkan dari larutan induk 100 ppm, dan masukkan ke dalam labu ukur 5 ml.

(2) Masukkan ke dalam masing-masing konsentrasi larutan standar quercetin secara berturut-turut 1,5 ml etanol 96%, 0,1 ml AlCl_3 , 0,1 ml CH_3COOK , tepatkan dengan akuades.

(3) Ukur absorbansi larutan tersebut pada panjang gelombang 435 nm.

f) Pengukuran absorbansi sampel

(1) Buat konsentrasi sampel 1000 ppm dengan cara mengencerkan dari larutan induk sampel 10.000 ppm dan masukkan ke dalam labu ukur 5 ml.

- (2) Masukkan ke dalam larutan sampel secara berturut-turut 1,5 ml etanol 96%, 0,1 ml AlCl_3 , 0,1 ml CH_3COOK , dan tepatkan dengan akuades.
 - (3) Ukur absorbansi larutan tersebut pada panjang gelombang 435 nm.
 - (4) Buat larutan sampel dalam dua kali replikasi.
- 2) Uji aktivitas antioksidan
- a) Pembuatan larutan induk sampel 1.000 ppm
 - (1) Timbang 25 mg sampel.
 - (2) Larutkan dengan metanol secukupnya hingga larut.
 - (3) Masukkan larutan ke dalam labu ukur 25 ml.
 - (4) Tambahkan metanol hingga mencapai tanda batas, kemudian homogenkan.
 - b) Pembuatan larutan DPPH
 - (1) Timbang 16 mg serbuk DPPH.
 - (2) Larutkan dengan metanol secukupnya hingga larut.
 - (3) Masukkan larutan ke dalam labu ukur 100 ml.
 - (4) Tambahkan metanol hingga mencapai tanda batas, kemudian homogenkan.
 - c) Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH
 - (1) Sebanyak 1 ml larutan DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml.
 - (2) Kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.
 - (3) Dihomogenkan, lalu diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap.
 - (4) Setelah diinkubasi, dituang ke dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
 - (5) Panjang gelombang maksimum berada pada 517 nm.
 - d) Pembuatan larutan blanko
 - (1) Sebanyak 1 ml larutan DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml.

- (2) Kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.
- (3) Dihomogenkan, lalu diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap.
- (4) Setelah diinkubasi, dituang ke dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 517 nm.

e) Pengukuran deret konsentrasi sampel

- (1) Buat deret konsentrasi larutan sampel dengan konsentrasi:
 - (a) Ekstrak akuades: 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, 50 ppm, 55 ppm, 60 ppm, 65 ppm, 70 ppm, 75 ppm, 80 ppm, 85 ppm.
 - (b) Ekstrak etanol 70%: 80 ppm, 85 ppm, 90 ppm, 95 ppm, 100 ppm, 105 ppm, 110 ppm, 115 ppm, 120 ppm, 125 ppm, 130 ppm, 135 ppm.
 - (c) Ekstrak etil asetat: 125 ppm, 130 ppm, 135 ppm, 140 ppm, 145 ppm, 150 ppm, 155 ppm, 160 ppm, 165 ppm, 170 ppm, 175 ppm, 180 ppm.

dengan cara mengencerkan dari larutan induk 1.000 ppm, dan masukkan ke dalam labu ukur 5 mL.
- (2) Tambahkan ke dalam masing-masing konsentrasi 1 ml larutan DPPH, dan tepatkan dengan metanol hingga tanda batas.
- (3) Inkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit.
- (4) Setelah diinkubasi, dituang ke dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 517 nm.

c. Pasca analitik

1) Interpretasi hasil penentuan kadar flavonoid total

a) Kurva standar quercetin

Buat persamaan regresi linear dari data di atas untuk menghitung konsentrasi flavonoid total dalam sampel. $Y = a + bx$ atau $Y = ax + b$.

b) Penentuan konsentrasi senyawa flavonoid dalam sampel ekstrak bahan alam

Plotkan absorbansi sampel pada persamaan regresi linier yang didapat dari kurva standar di atas (mg QE/g ekstrak) (Ratih dan Habibah, 2024).

2) Interpretasi hasil penentuan aktivitas antioksidan

Dari nilai absorbansi DPPH, persentase penghambatan radikal DPPH dihitung untuk mendapat % inhibisi. Setelah menggunakan % inhibisi kemudian nilai IC₅₀ dihitung. Setelah mendapatkan nilai IC₅₀, nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*) dari setiap ekstrak dapat dihitung. Semakin tinggi nilai AAI, semakin kuat aktivitas antioksidan ekstrak tersebut.

a) Penentuan % inhibisi

Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai % inhibisi, yang dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

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

b) Penentuan nilai IC₅₀

% inhibisi yang diperoleh sebelumnya kemudian diplot pada sumbu y dan x pada persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear yang didapat dalam bentuk $y = a + bx$. Persamaan ini digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dari masing-masing sampel dengan mensubstitusikan nilai $y = 50$, dan nilai x yang akan diperoleh dari IC₅₀. Nilai IC₅₀ menyatakan besar konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas DPPH sebesar 50% (Souhoka, Hattu dan Huliselan, 2019).

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

Nilai AAI dapat ditentukan dengan cara konsentrasi DPPH yang digunakan dalam uji (ppm) dibagi dengan nilai IC_{50} yang diperoleh (ppm) (Sawiji dan La, 2021).

Perhitungan nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI) digunakan untuk mengetahui indeks aktivitas antioksidan dengan rumus sebagai berikut:

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

3) Pengolahan limbah

- a) Limbah bahan baku herbal dipisahkan, lalu dikeringkan dan digunakan sebagai pupuk.
- b) Limbah bahan kimia yang digunakan dibuang pada saluran pembuangan khusus.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

- a. *Editing*, pada tahap ini mengevaluasi data yang telah terkumpul untuk memastikan apakah data tersebut sudah memenuhi syarat kelengkapan, konsistensi, dan kesesuaian dengan tujuan penelitian.
- b. *Coding*, adalah tahapan di mana data dikodekan untuk mengonversi informasi menjadi format kuantitatif. Pengkodean data diperlukan dalam berbagai jenis pemrosesan data, baik melalui metode manual maupun dengan bantuan program komputer.

- c. *Data entry*, data yang telah diberi kode selanjutnya dimasukkan ke dalam aplikasi pengolahan data seperti SPSS untuk dipersiapkan dalam proses analisis lebih lanjut.
- d. Tabulasi data, data disusun dan disajikan dalam format tabel agar lebih mudah dipahami dan dianalisis sesuai kebutuhan penelitian.

2. Analisis data

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh berbagai jenis pelarut, termasuk etanol 70%, akuades, dan etil asetat, terhadap kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan. Metode yang digunakan untuk menganalisis data adalah:

- a. Uji normalitas terlebih dahulu dengan uji *Shapiro Wilk* untuk mengetahui uji parametrik atau non parametrik yang akan digunakan. Uji ini dipilih karena uji ini efektif dan valid digunakan untuk sampel yang berjumlah kecil. Dalam uji *Shapiro Wilk* disajikan data berdistribusi normal jika nilai sig $> 0,05$. Jika data tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*.
- b. Apabila hasil sebaran data normal, maka untuk melihat perbedaan kadar dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis dengan uji statistik ANOVA satu arah (*One Way ANOVA*). Sedangkan apabila hasil sebaran data tidak normal, maka masing-masing kelompok perlakuan dianalisis dengan uji statistik Nonparametrik *Kruskal-Wallis* dilakukan untuk mengevaluasi perbedaan yang signifikan antara jenis pelarut (Etanol 70%, akuades dan etil asetat) terhadap kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan daun sirsak. H_0 menyatakan bahwa perbedaan jenis pelarut tidak memiliki pengaruh yang signifikan (tidak berbeda nyata), sedangkan H_a menyatakan bahwa perbedaan jenis pelarut memiliki pengaruh yang signifikan (berbeda nyata) terhadap kadar

flavonoid total dan aktivitas antioksidan daun sirsak. Kriteria signifikansi ditetapkan sesuai dengan hasil uji statistik.

- c. Analisis *Post Hoc Test (Tukey Test)* merupakan analisis lanjutan dalam uji *One-Way-ANOVA* untuk melihat adanya perbedaan yang lebih spesifik antara jenis pelarut terhadap kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan.
- d. Analisis *Mann-Whitney*, merupakan analisis lanjutan (*post hoc*) apabila hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan antar kelompok berdasarkan jenis pelarut yang digunakan.

H. Etika Penelitian

Etika merupakan cabang ilmu yang berkaitan dengan tata kebiasaan. Setiap penelitian harus berlandaskan prinsip etika agar tidak menimbulkan dampak merugikan. Dalam penelitian ini berkomitmen pada dua prinsip *beneficence* yang mendorong upaya menghadirkan manfaat sebesar-besarnya, dan prinsip *non-maleficence* yang berupaya mencegah atau meminimalkan segala kemungkinan risiko atau dampak buruk bagi pihak yang terlibat (Haryani dan Setyobroto, 2022).