

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *quasi eksperimen* karena pada situasi penelitian ini tidak memungkinkan untuk membentuk kelompok kontrol yang sebanding (Sugiyono, 2023). Rancangan yang digunakan *one-group posttest only* 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 salam. 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

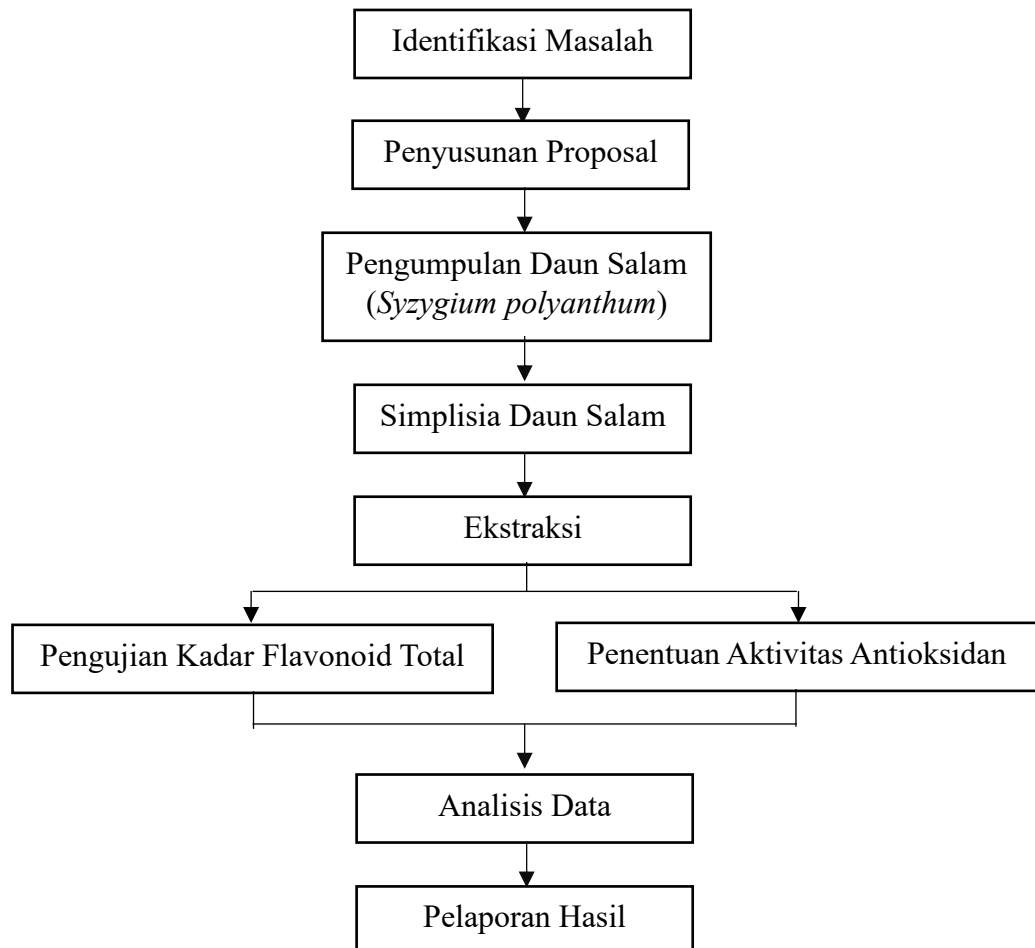
O₁ = Kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan

O₂ = Kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan

O₃ = Kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan

B. Alur Penelitian

Alur penelitian pada penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 5 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

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

D. Unit Analisis

Unit analisis dari penelitian ini adalah kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan pada berbagai jenis pelarut yaitu etanol 70%, akuades, dan etil asetat pada daun salam (*Syzygium polyanthum*). Sampel daun salam yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Br. Pande, Desa Abiansemal, Kecamatan Abiansemal, Kabupaten Badung, Bali. Teknik pengambilan sampel dilakukan berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi

Terdapat beberapa kriteria inklusi pada penelitian ini meliputi sampel daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan lembaran daun yang utuh, daun salam yang diambil dari lokasi yang sama, daun yang digunakan merupakan daun ke-3 sampai ke-5 dari pucuk cabang (Tanjung, 2024).

2. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi pada penelitian ini yaitu lembaran daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang berjamur ditandai dengan adanya bercak putih atau abu atau hitam, daun berwarna kuning atau kecoklatan dan terdapat hama yang menempel di sekeliling daun tanaman.

Besar sampel daun salam yang digunakan 6 kg sampel mentah dan digunakan sebanyak 2000/gram serbuk simplisia daun salam 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 pada pelaksanaan penelitian ini terbagi menjadi dua jenis data yaitu data primer dan data sekunder.

- a. Data primer merupakan hasil pengukuran kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak daun salam dengan pelarut etanol 70%, akuades dan etil asetat.
- b. Data sekunder dalam penelitian ini meliputi yang berasal dari berbagai sumber pustaka, seperti jurnal, karya ilmiah, skripsi, dan e-book yang relevan dengan topik penelitian.

2. Teknik pengumpulan data

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

pengumpulan data untuk mengukur aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil 1-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri UV-Vis.

F. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

Adapun alat yang dipakai dalam pembuatan ekstrak daun salam dalam penelitian ini antara lain gelas ukur, labu ukur, corong gelas, batang pengaduk, pipet tetes, labu erlenmeyer, *beaker glass*, pipet volume, timbangan analitik, blender, *rotary ovaporator*, 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, gelas ukur, *beaker glass*, labu takar, corong gelas, batang pengaduk, pipet tetes, labu erlenmeyer, pipet volume, *pipette bulb*, spatula.

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun salam dalam penelitian ini adalah daun salam, 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 kuarsetin, etanol 96%, AlCl_3 , kalium asetat, akuabides, etanol 70%, akuades, etil asetat. Sementara bahan analisis aktivitas antioksidan adalah sampel ekstrak bahan alam, DPPH, aluminium foil, etanol 70%, akuades, dan etil asetat.

3. Prosedur kerja

a. Pra analitik

- 1) Pengambilan, pengelolaan sampel daun salam, dan pembuatan ekstrak
 - a) Melakukan penyortiran dengan kriteria yang digunakan pada sampel daun salam segar yang telah diperoleh
 - b) Selanjutnya mencuci sampel daun salam sampai bersihkan dari kotoran menggunakan air mengalir lalu ditiriskan.
 - c) Setelah itu cacah daun salam dan ditimbang berat daun yang masih segar.
 - d) Kemudian daun salam yang sudah dicacah tadi dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.
 - e) Setelah kering, sampel dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk.
 - f) Kemudian ayak menggunakan ayakan berukuran 60 mesh bubuk yang sudah dihaluskan tadi untuk mendapatkan bubuk daun salam.
 - g) Selanjutnya siapkan wadah yang tertutup lalu tempatkan bubuk daun salam di dalamnya.
- 2) Ekstraksi
 - a) Pertama, sebanyak 400/gram serbuk simplisia daun salam dimasukan ke dalam masing-masing wadah.
 - b) Selanjutnya serbuk diekstraksi menggunakan berbagai jenis pelarut (etanol 70%, akuades, etil asetat) sebanyak 2000 ml (perbandingan antara serbuk simplisia dengan pelarut yaitu 1:5) (Saerang, Edy dan Siampa, 2023).
 - c) Kemudian ditutup menggunakan aluminium foil dan dibiarkan selama tiga hari dengan dilakukan pengadukan secara rutin setiap 8 jam sekali (dilakukan 2 kali sehari) lalu ekstrak disaring.

- d) Bagian ampasnya juga diremaserasi sebanyak tiga kali dengan perlakuan yang sama.
- e) Filtrat yang dihasilkan digabungkan selanjutnya dipekatkan menggunakan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.
- f) Selanjutnya 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 dimasukan 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 dimasukan 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: 75 ppm, 80 ppm, 85 ppm, 90 ppm, 95 ppm, 100 ppm, 105 ppm, 110 ppm, 115 ppm, 120 ppm, 125 ppm, 130 ppm.
- (b) Ekstrak etanol 70%: 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, 50 ppm, 55 ppm, 60 ppm.
- (c) Ekstrak etil asetat: 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, 50 ppm, 55 ppm, 60 ppm, 65 ppm, 70 ppm, 75 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 kuersetin

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 persen inhibisi

Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai persentase 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

Persentase 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% (Septiani, Gatera dan Ratnasari, 2022).

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

Nilai AAI dapat ditentukan dengan cara konsentrasi DPPH yang digunakan dalam uji (ppm) dibagi dengan nilai IC₅₀ yang diperoleh (ppm) (Mamay, Wardani dan Hakim, 2022). Perhitungan nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI) digunakan untuk mengetahui indeks aktivitas antioksidan dengan rumus sebagai berikut:

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

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*, merupakan tahap penilaian untuk mengukur apakah kriteria data yang dibutuhkan untuk menjawab pertanyaan penelitian telah mencapai standar kelengkapan, konsistensi, dan penerapan yang diperlukan
- b. *Coding*, adalah tahapan di mana data dikodekan untuk mengonversi informasi kualitatif menjadi format kuantitatif. Pengodean data diperlukan dalam berbagai jenis pemrosesan data, baik melalui metode manual maupun dengan bantuan program komputer.
- c. *Data entry*, merupakan tindakan menganalisis data yang telah dikode dengan memasukkan informasi tersebut ke dalam program SPSS.
- d. Tabulasi data, merupakan langkah membuat representasi data dalam bentuk tabel sesuai dengan kebutuhan analisis dalam penelitian.

2. Analisis data

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh berbagai jenis pelarut, termasuk etanol 96%, akuades, dan etil asetat, terhadap tingkat senyawa flavonoid

total dan aktivitas antioksidan. Metode yang digunakan untuk menganalisis data adalah:

- a. Data yang sudah dikumpulkan kemudian diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui uji parametrik atau nonparametrik yang akan digunakan. Uji ini dipilih karena efektif dan valid digunakan untuk sampel yang berjumlah kecil yaitu kurang dari 30. Dalam uji *Shapiro-Wilk* data berdistribusi normal jika nilai $\text{sig} > 0,05$. Gunakan uji *Kruskal Wallis* jika data tidak berdistribusi normal.
- b. Hasil sebaran data yang berdistribusi normal dianalisis menggunakan uji statistik ANOVA satu arah (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan kadar antar kelompok perlakuan. 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 salam. 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 salam. 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*) yang dilakukan setelah uji *Kruskal–Wallis* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

H. Etika Penelitian

Etika merupakan ilmu tentang adat kebiasaan. Setiap penelitian harus didasarkan pada prinsip etika penelitian. Etika penelitian yang diterapkan pada penelitian ini adalah *beneficence*, *non-maleficence*, dan *justice* (Haryani dan Setyobroto, 2022).

1. *Beneficence*

Prinsip berbuat baik (*beneficence*) menekankan bahwa penelitian harus memberikan manfaat sebesar-besarnya.

2. *Non-maleficence*

Prinsip tidak merugikan (*non-maleficence*) menuntut penelitian untuk meminimalkan segala bentuk risiko dan dampak negative.

3. *Justice*

Prinsip keadilan (*justice*) menekankan distribusi manfaat dan beban penelitian secara adil.