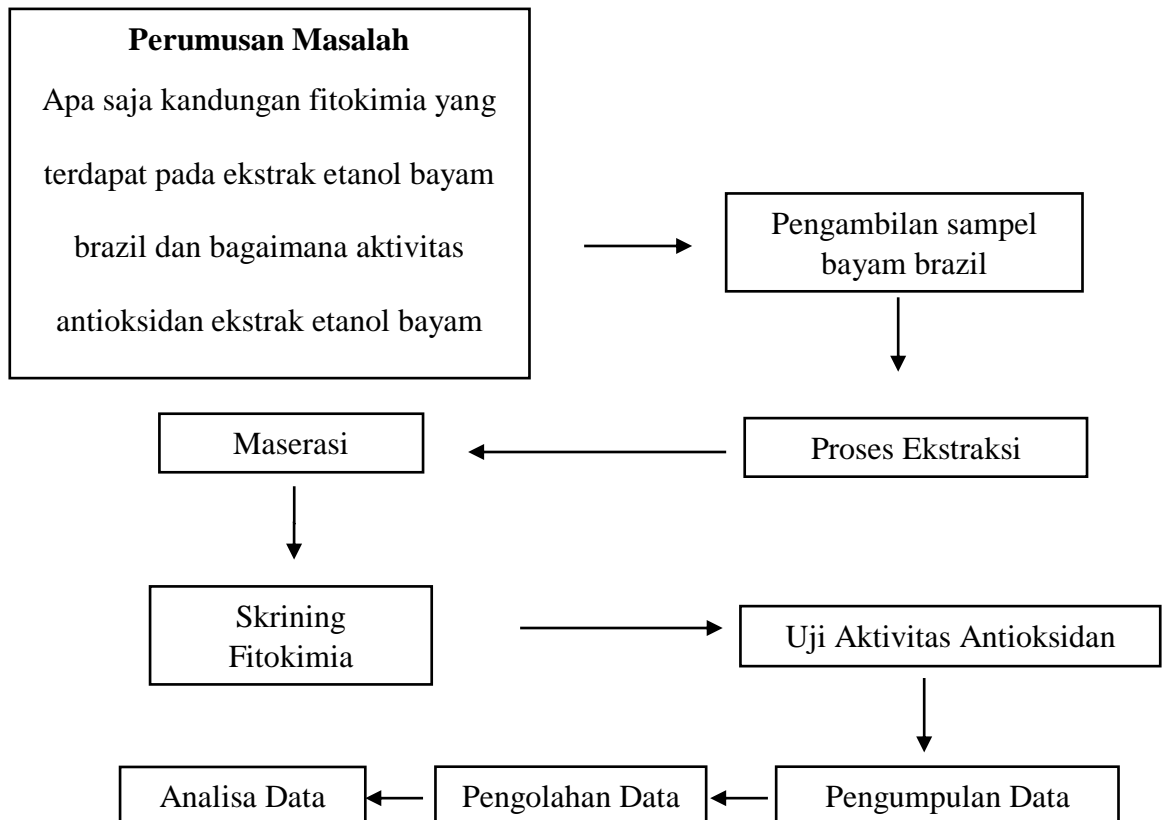


BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental merupakan penelitian yang didalamnya melibatkan manipulasi terhadap kondisi subyek yang diteliti, disertai upaya kontrol yang ketat terhadap faktor-faktor luar serta melibatkan subyek pembanding atau metode yang sistematis (Sugiyono, 2015).

B. Alur Penelitian



C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat yang digunakan untuk penelitian adalah Laboratorium Kimia Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenskes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai April 2022.

D. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% daun bayam brazil yang diperoleh dari perkebunan *Kadek Organik Farm*. Kriteria inklusi dari daun bayam brazil yang akan digunakan adalah daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau, segar, tidak berlubang, berukuran 3-5 cm. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu, daun yang layu, berwarna kuning, dan berlubang. Sehingga dalam penelitian ini menggunakan sampel yang memenuhi kriteria inklusi.



(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Gambar 3. Sampel yang memenuhi kriteria inklusi

E. Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data pada penelitian ini adalah dengan pengamatan langsung yaitu dengan cara menganalisis secara kualitatif kandungan fitokimia dan uji antioksidan pada ekstrak bayam brazil. Analisis kualitatif adalah analisis untuk melakukan indentifikasi elemen, spesies atau senyawa-senyawa yang ada di dalam sampel (Ganjar dan Rochman, 2007).

F. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari blander (getra), alat timbang (kern), saringan, toples, pipet tetes, tabung reaksi (iwaki), labu ukur (iwaki), rotary evaporator (buchi), spektrofotometer UV-vis.

G. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bayam brazil (*Altehrmanthera sisso*), etanol 70%, asam sulfat, pereaksi dragendorff, serbuk magnesium, ammonia, H₂SO₄ HCl dan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylldrakil*).

H. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan yaitu :

1. Pengambilan bahan

Daun bayam brazil diambil dari perkebunan Kadek Organik Farm yang berwarna hijau, tidak terlalu mudan dan tidak terlalu tua, berwarna hijau, segar, tidak berlubang dan memiliki ukuran 3-5 cm.

2. Pembuatan serbuk simplisia

Daun bayam brazil yang telah didapatkan ditimbang dan disortasi, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditimbang berat daun yang masih segar, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering daun kembali disortasi untuk memisahkan dari bahan-bahan yang ikut tercampur dalam proses pengeringan, kemudian diserbukkan dengan cara diblender atau ditumbuk dan ditimbang berat keringnya.



(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Gambar 4. Proses Pengeringan

3. Ekstraksi

Sampel tanaman dikeringkan dan dihaluskan. Setelah itu diekstraksi dengan metode maserasi dengan menimbang serbuk simplisia daun bayam brazil sebanyak 647 gr direndam dengan 3000 ml etanol 70% lalu ditutup dan dibiarkan selama 2 hari. Setelah 2 hari saring etanol kemudian ampas daun bayam brazil ditambahkan 3000 ml etanol 70% lalu ditutup dan biarkan selama 2 hari. Setelah 2 hari, etanol dan ampas bayam brazil kembali disaring, lakukan hal yang sama kemudian simpan selama 3 hari. Setelah disimpan selama 3 hari maserat dituang dan disaring. Hasil maserat kemudian diuapkan dengan rotary evaporator dengan

suhu 50⁰ C, hingga dihasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut ditimbang dan dihitung rendemen ekstrak kentalnya (Depkes RI, 2000).

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

Pelarut etanol 70% digunakan karena etanol 70% dapat menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia (Snyder, 1997)

4. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, dan steroid.

a. Alkaloid

Uji *alaloid* dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes pereaksi dragendroff. Hasil uji positif diperoleh bisa terbentuk endapan coklat (Junaid, 2020)

b. Flavanoid

Sejumlah sampel ditambahkan ammonia dan H₂SO₄ Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya kuning.

c. Tanin

Sebanyak 1 ml ekstrak ditambahkan dengan air panas secukupnya, kemudian didihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat sebanyak 5 ml ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, kemudian dikocok. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga.

d. Saponin

Saponin dapat dideteksi dengan uji busa dalam air panas. Busa yang stabil akan terus terlihat selama 5 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan adanya *saponin*.

e. Steroid dan triterpenoid

Sejumlah sampel ditambahkan H_2SO_4 lalu dikocok. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan kuning keemasan.

5. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui pada serapan berapa zat yang dibaca oleh spektrofotometer Uv-vis secara optimum, bentuk kurva absorbansi yang linier dan menghasilkan hasil yang cukup konstan jika dilakukan berulang kali. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan memasukan metanol sebanyak 3 ml ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan DPPH sebanyak 1 ml dan tutup tabung reaksi dengan aluminium foil. Selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet dan dicari λ_{maks} larutan pada rentangan panjang gelombang 515-120 (Molyneux, 2004). Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan melihat nilai absorbansi yang konstan dan memiliki nilai yang paling optimum. Kemudian dicatat hasil pengukuran untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Hanani, 2005).

Tahap selanjutnya yaitu absorbansi kontrol dengan mengambil 1 ml larutan DPPH dan dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan etanol sebanyak 3 ml setelah itu tutup tabung reaksi dengan aluminium foil agar tidak terkontaminasi dengan udara luar, lalu inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit (Holil, 2020; djordjevic, 2011). Setelah itu dimasukan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-vis.

Selanjutnya absorbansi sampel ekstrak dilarutkan dalam pelarut etanol dengan variasi konsentrasi 0.25 ppm, 0.50 ppm, dan 1 ppm. Variasi konsentrasi tersebut dihitung dengan menggunakan rumus

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

Masing-masing variasi diambil sebanyak 3 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan DPPH sebanyak 1 ml ke dalam masing-masing variasi. Kemudian tutup tabung reaksi dengan aluminium foil agar tidak terkontaminasi dengan udara luar, lalu dinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit (Holil, 2020). Data absorbansi yang diperoleh dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya.

Tabel 3

Kriteria Nilai IC50 Berdasarkan Nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*)

| Nilai IC50 (ppm) | Kategori |
|------------------|-------------|
| >2,0 | Sangat Kuat |
| 1,0-2,0 | Kuat |
| 0,5-1,0 | Sedang |
| <0,5 | Lemah |

Sumber: Scherer dan Godoy (2019)

I. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Pengolahan data penelitian ini dilakukan dengan cara analisis kualitatif yaitu menjelaskan *tanin, flavonoid, alkaloid, steroid dan saponin* dalam bayam brazil. Untuk menentukan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dihitung dengan menggunakan persamaan

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

Nilai % IC50 (*Inhibition Concentration 50*) menentukan nilai IC 50 diperoleh garis 50% daya hambat dengan sumbu konsentrasi, dengan persamaan $y=ax + b$ dimana $y=50$ dan x adalah konsentrasi larutan uji yang mampu menghambat 50% larutan radikal bebas.

Misalnya diperoleh persamaan $y=5,2152x + 4,9217$, maka:

$$Y= 5,212x + 4,9217$$

$$50= 5,2152 + 4,9217$$

$$X= \frac{50 - 4,9217}{5,2152} = 8,6$$

Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan hasil nilai $x=8,6$ atau nilai IC50= 8,6 artinya aktivitas antioksidan sampel tersebut termasuk sangat kuat.

2. Analisis data

Analisis data hasil uji fitokimia akan dianalisis secara deskriptif sedangkan aktivitas antioksidan akan dianalisis secara deskriptif kuantitatif.