

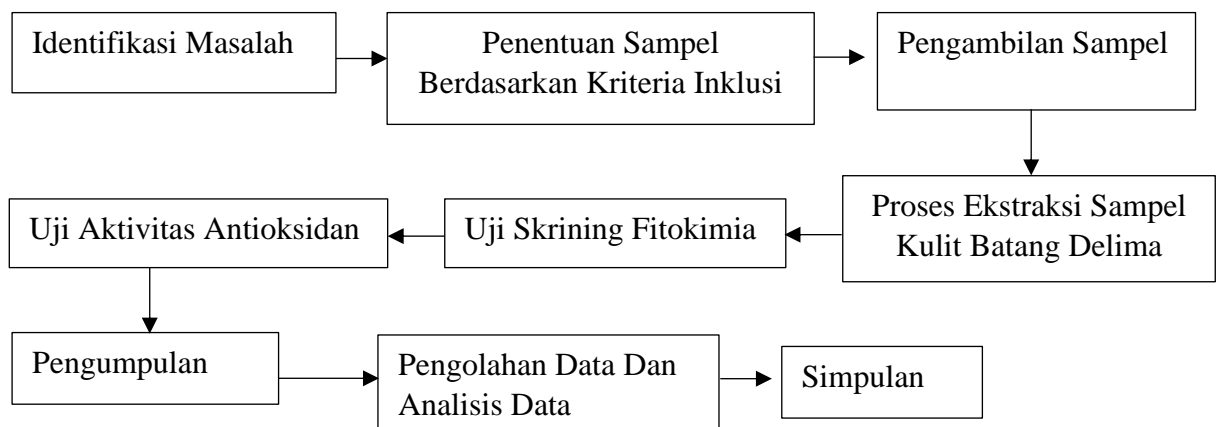
## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Penelitian ini masuk ke dalam jenis penelitian deskriptif. Pengujian skrining fitokimia pada ekstrak etanol kulit batang delima (*Punica granatum L*) menggunakan metode kualitatif dan uji aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit batang delima (*Punica granatum L*) menggunakan metode kuantitatif. Penelitian deskriptif ialah penelitian yang ditunjukkan untuk menampilkan, fakta yang akurat tentang sifat-sifat tertentu.

#### B. Alur Penelitian



**Gambar 3. Bagan Alur Penelitian**

#### C. Tempat dan Waktu penelitian

##### 1. Tempat penelitian

Pemeriksaan skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Denpasar.

## 2. Waktu penelitian

Waktu penelitian akan dilaksanakan pada bulan November 2023 hingga April 2024.

## D. Sampel

### 1. Sampel penelitian

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini ialah kulit batang delima (*Punica granatum L.*) yang didapatkan dari Banjar Sumbul, Desa Yehembang Kangin, Kecamatan Mendoyo, Kabupaten Jembrana, Provinsi Bali.

### 2. Kriteria sampel

#### a. Inklusi

Kriteria inklusi dari kulit batang delima yang akan digunakan adalah kulit batang yang segar, berwarna hijau tua hingga coklat, serta tidak berlubang. Dibutuhkan kulit batang delima sebanyak 2 kg tanaman segar untuk dikeringkan. Dengan ukuran kulit batang yang akan digunakan yaitu 15 cm.



Sumber : Dokumentasi Pribadi

**Gambar 4. Kulit Batang Delima (*Punica granatum L.*)**

## **b. Eksklusi**

Kriteria eksklusi yaitu, kulit batang yang berisi hama. Pada penelitian ini menggunakan sampel yang memenuhi kriteria inklusi.

## **E. Jenis dan Teknik pengumpulan Data**

### **1. Jenis data yang dikumpulkan**

Pada penelitian ini, terdapat berbagai jenis data yang akan dikumpulkan yaitu data primer yang terdiri dari kandungan fitokimia serta antioksidan ekstrak etanol kulit batang delima (*Punica granatum L.*).

### **2. Cara pengumpulan data**

Metode pengumpulan data dalam penelitian ini ialah dengan melakukan percobaan uji laboratorium secara langsung. Data dikumpulkan melalui uji kandungan fitokimia secara kualitatif serta uji aktivitas antioksidan dalam ekstrak etanol kulit batang delima (*Punica granatum L.*).

Analisis kualitatif ialah studi penelitian yang berupaya memahami kejadian-kejadian setting serta kontes yang natural. Dimana studi kualitatif ini beralaskan pada paradigma postpositivisme yang tidak berupaya untuk membangun perlakuan atau pengkondisian atau memanipulasi fenomena yang diamatinya (Wijaya, 2019).

Analisis kuantitatif adalah penelitian yang memakai epistemology objektif pada perspektif positivism. Jenis penelitian hendak menguji hipotesis dengan tujuan untuk mendapatkan serta memastikan generalisasi dan menekankan pada hubungan sebab akibat antar-variabel (Wijaya, 2019).

### **3. Alat dan bahan**

#### **a. Alat**

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu terdiri dari alat timbang, blender, saringan, toples, batang pengaduk, pipet tetes, pipet ukur 5 mL, boll pipet, tabung reaksi, labu ukur, *rotary evaporator*, spektrofotometer UV-Vis.

#### **b. Bahan**

Bahan yang dipakai pada penelitian ini yaitu kulit batang delima (*Punica granatum L.*), etanol 96%, asam sulfat, *pereaksi dragendroff*, *pereaksi mayer wagner*, serbuk magnesium, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCL dan serbuk DPPH (*1,1-difenil-2pikrilhidrlazil*) *pereaksi besi (III) klorida* 1%, asam klorida 2N.

### **4. Prosedur penelitian**

#### **a. Pengambilan sampel**

Sampel yang diambil yaitu berupa kulit batang delima (*Punica granatum L.*) didapat dari Desa Yehembang Kangin, Kabupaten Jembrana. Dimana kulit batang delima (*Punica granatum L.*) yang dipilih yaitu kulit batang yang berwarna hijau hingga coklat, serta tidak berlubang yang sudah dipisahkan dari batang tumbuhan delima (*Punica granatum L.*) dengan cara dikupas. Kulit batang yang dimaksud yaitu bagian epidermis dari batang delima.

#### **b. Pengolahan sampel**

Sampel kulit batang delima (*Punica granatum L.*) yang sudah dikumpulkan ditimbang kulit batang yang masi segar sejumlah 2 kg dan disortasi basah kemudian di cuci dengan air mengalir dan timbang berat kulit batang yang masih segar, lalu sampel dikeringkan, setelah kering sampel disortasi kering, kemudian dilakukan

proses ekstraksi, atau kulit batang delima yang sudah kering di blender ataupun ditumbuk agar menjadi serbuk kemudian timbang berat keringnya.

c. Ekstraksi

Sampel kulit batang delima yang sudah dikeringkan serta dihaluskan sehingga diperoleh serbuk simplisia. Simplisia kulit batang delima diekstraksi menggunakan metode maserasi. Dimana serbuk simplisia dimasukkan ke dalam toples kaca lalu ditambahkan dengan larutan penyari etanol 96% menggunakan perbandingan (1:5) hingga terendam sembari sesekali diaduk. Diamkan selama 2 hari. Setelah 2 hari, etanol dan ampas kulit batang delima disaring. Ampas kulit batang direndam kembali menggunakan etanol, lalu diamkan selama 2 hari. Setelah 2 hari, saring kembali etanol dan ampas kulit batang delima. Kemudian lakukan hal yang sama lalu simpan selama 3 hari. Setelah 3 hari maserat dituangkan dan disaring. Hasil maserat kemudian diuapkan dengan rotary evaporator dengan suhu 50°C, sampai menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut ditimbang serta dihitung rendemen ekstrak kentalnya (Depkes RI, 2019). Perhitungan rendemen ekstrak bisa dihitung menggunakan Rumus :

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

Etanol mempunyai struktur C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, mudah menguap, tidak berwarna, serta polar maka dipakai sebagai pelarut berbagai senyawa (Ratih & Habibah, 2022). Pelarut etanol 96% digunakan karena selektif, tidak toksik, absorbansinya baik serta kapasitas penyariannya yang cukup tinggi sehingga bisa menyari senyawa yang bersifat non-polar, semi polar, serta polar. Dimana pelarut etanol 96% mudah masuk berpenetrasi ke dalam dinding sel sampel ketimbang pelarut etanol dengan

konsentrasi lebih rendah, hingga dapat menghasilkan ekstrak yang pekat (Wendersteyt dkk., 2021).

d. Skrining fitokimia

Adapun prosedur kerja dari skrining fitokimia ekstrak etanol kulit batang delima yang diadaptasikan dari penelitian yang dilakukan oleh (Riwanti & Izazih, 2019), yaitu sebagai berikut :

1) Uji Tanin

Pipet 5 tetes ekstrak lalu tambahkan 5 tetes aquadest kemudian dididihkan. Tambahkan 5 tetes  $\text{FeCl}_3$ , bila positif tanin akan menunjukkan adanya perubahan warna hijau kecoklatan atau hitam kebiruan.

2) Uji Saponin

Pipet 5 tetes ekstrak ditambah 5 tetes aquadest kemudian kocok kuat selama 30 detik, bila positif senyawa saponin akan menunjukkan adanya busa yang stabil.

3) Uji Flavonoid

Pipet 5 tetes ekstrak kemudian tambahkan 0,1 mg serbuk Mg serta ditambahkan 0,4 ml amil alcohol dan 4 ml etanol, bila positif senyawa flavonoid akan menunjukkan perubahan warna pink, magenta serta jingga.

4) Uji Alkaloid

Pipet 5 tetes ekstrak di tambahkan dengan sedikit HCL 1%, kemudian di tambahkan 5 tetes pereaksi mayer, bila positif senyawa alkaloid akan menunjukkan adanya endapan atau kekeruhan.

5) Uji Steroid

Pipet 5 tetes ekstrak di tambahkan dengan 5 tetes Kloroform serta 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pereaksi *Lieberman Buchard*). Bila positif senyawa steroid akan menunjukkan adanya warna hijau kekuningan.

6) Uji Terpenoid

Pipet 5 tetes ekstrak ditambahkan sedikit asetat anhidrat serta H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pereaksi *Lieberman Buchard*). Bila positif senyawa terpenoid akan menunjukkan adanya warna hijau kekuningan.

e. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Adapun prosedur kerja dari uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit batang delima yang diadaptasikan dari penelitian yang dilakukan oleh (Fauzi & Santoso, 2021) yaitu sebagai berikut :

1) Pembuatan blanko DPPH 0,1 mM

Serbuk dpph ditimbang sejumlah 4 mg serta dilarutkan dalam metanol hingga tepat 100 mL (0,1 mM).

2) Pembuatan larutan induk

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dalam 100 ml etanol, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.

3) Pembuatan seri konsentrasi ekstrak

Seri konsentrasi yang digunakan 25 ppm, 50 ppm , 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm. Rumus konsentrasi sampel yaitu  $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ .

Menggunakan labu ukur 10 ml dalam konsentrasi 25 ppm.

$$10 \times 25 = V_2 \times 1000$$

$$250 = V_2 \times 1000$$

$$V_2 = 0,25$$

Pipet sampel yang telah dilarutkan dalam 1000 ppm sebanyak 0,25 ml ke dalam tabung dengan label konsentrasi 25 ppm kemudian tambahkan etanol hingga tanda batas, kemudian lakukan hal yang berulang hingga sampel dengan konsentrasi 150 ppm dengan jumlah sampel yang sudah dihitung menggunakan rumus yang sama.

#### 4) Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Sejumlah 2 ml DPPH 0,1 mM dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian tambahkan 2 ml ekstrak etanol kulit batang delima dengan berbagai konsentrasi, lalu distirer 1 menit hingga homogen dan diamkan selama 30 menit ditempat gelap, baca absobansinya pada  $\lambda$  maksimal (517 nm).

Persentase inhibisi ( $IC_{50}$ ) terhadap radikal DPPH dari tiap konsentrasi larutan sampel dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \%$$

Aktivitas antioksidan dinyatakan inhibition concentration 50% atau  $IC_{50}$  adalah konsentrasi sampel yang bisa meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dari nilai x sesudah mengganti y dengan 50. Sesudah mendapatkan persentase inhibisi dari tiap konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linear menggunakan persamaa :

$$Y = A + Bx$$

X = konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )

Y = persentase inhibisi (%) (Nur, 2019).

**Tabel 2**

**Sifat Antioksidan Berdasarkan (*Antioxidant Activity Index*) AAI**

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

Sumber : (Paraeng et al., 2016).

## **F. Pengolahan Data dan Analisis Data**

### **1. Pengolahan data**

Pengolahan data penelitian skrining fitokimia dilakukan menggunakan cara analisis data deskriptif yaitu menjelaskan senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan tanin yang terdapat pada air ekstrak etanol kulit batang delima.

Adapun cara menentukan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dihitung menggunakan persamaan :

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC<sub>50</sub> (*Inhibition Concentration*) dipakai untuk menentukan konsentrasi larutan uji yang mempunyai daya hambat 50% terhadap larutan radikal bebas. Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan dengan menggambarkan garis yang melewati titik 50% daya hambat pada sumbu konsentrasi, dengan memakai  $y = a + bx$  dimana  $y = 50$  serta  $x$  yaitu konsentrasi larutan uji yang bisa menghambat 50% larutan radikal bebas.

Adapun contoh perhitungan yang diadaptasikan dari skripsi Suhaling (2012) tentang Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kacang Merah (*Phaseolus*

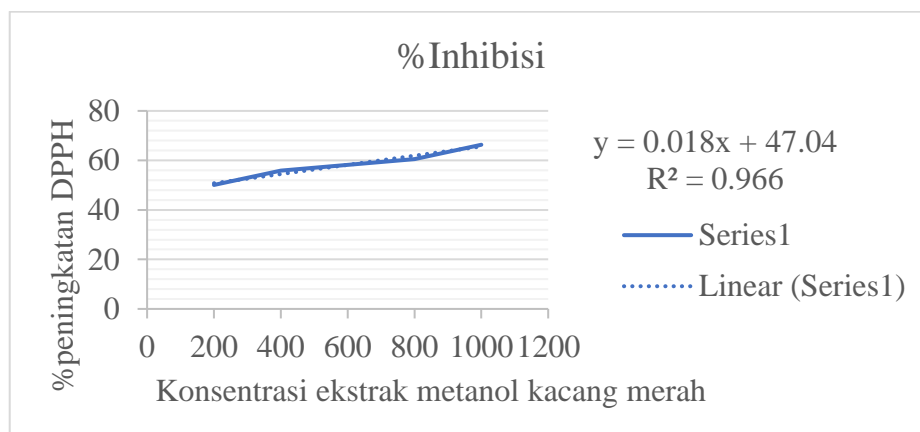
*vulgaris L.*) Dengan Metode DPPH, dengan hasil pengukuran blanko sebesar 0.8759, yaitu sebagai berikut ;

**Tabel 3**  
**Hasil Pengukuran Serapan Ekstrak Methanol Kacang Merah Terhadap DPPH**

Konsentrasi Ekstrak Metanol Kacang Merah (ppm)	Absorbansi Rata-rata
200	0.4372
400	0.3867
800	0.3457
1000	0.2954

**Tabel 4**  
**Hasil Pengukuran % Inhibisi**

Konsentrasi Ekstrak Metanol Kacang Merah (ppm)	Absorbansi Rata-rata
200	50.08%
400	55.85%
800	60.35%
1000	66.32%



Sumber : Suhaling (2012)

**Gambar 4. Contoh Grafik Hasil Pengukuran % Inhibisi**

Contoh perhitungan % inhibisi :

$$\text{Rumus : \% Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \%$$

- Sampel 200 ppm = % Inhibisi =  $\frac{0.8759 - 0.4372}{0.8759} \times 100 \% = 50,08\%$
- Sampel 400 ppm = % Inhibisi =  $\frac{0.8759 - 0.3867}{0.8759} \times 100 \% = 55,85\%$
- Sampel 800 ppm = % Inhibisi =  $\frac{0.8759 - 0.3457}{0.8759} \times 100 \% = 60,53\%$
- Sampel 1000 ppm = % Inhibisi =  $\frac{0.8759 - 0.295}{0.8759} \times 100 \% = 66,32\%$

Contoh perhitungan  $IC_{50}$  pada ekstrak methanol kacang merah. Diperoleh persamaan  $y = 47,04 + 0,018x$ ,  $y = IC_{50} = 50$ .

$$Y = A + BX$$

$$50 = 47,04 + 0,018X$$

$$X = \frac{(50 - 47,04)}{0,018}$$

$$X = 164,44 \text{ ppm}$$

Jadi, nilai  $IC_{50}$  pada ekstrak methanol kacang merah adalah 164,44 ppm.

Contoh perhitungan nilai AAI dari ekstrak methanol kacang merah, dengan konsentrasi DPPH yang digunakan adalah 15 mg/100 ml = 150 ppm serta nilai  $IC_{50}$  ekstrak methanol kacang merah diperoleh sebesar 164,44 ppm.

$$AAI = \frac{\text{Konsentrasi DPPH yang digunakan}}{\text{Nilai } IC_{50} \text{ yang diperoleh}}$$

$$AAI = \frac{150 \text{ ppm}}{164,44 \text{ ppm}}$$

$$AAI = 0,9121$$

Jadi, nilai AAI dari ekstrak methanol kacang merah adalah 0,9121 dan tergolong sedang.

## **2. Analisis data**

Analisis data hasil uji fitokimia akan dilakukan secara deskriptif kualitatif dengan menjelaskan kandungan senyawa metabolit sekunder yang ditemukan pada ekstrak etanol kulit batang delima. Sedangkan analisis aktivitas antioksidan akan dilakukan secara deskriptif kuantitatif, yang disajikan dalam bentuk tabel dan disusun berdasarkan intensitas nilai IC50.