

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis penelitian deskriptif observatif dengan menggunakan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Penelitian bersifat kualitatif untuk uji skrining fitokimia karena tujuannya adalah mengetahui keberadaan kandungan senyawa metabolit sekunder pada *infused water* buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*). Selain itu, penelitian juga bersifat kuantitatif untuk uji aktivitas antioksidan pada *infused water* buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) yang tujuannya untuk mengetahui nilai aktivitas antioksidan yang dinyatakan dengan nilai IC₅₀.

3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

3.2.1. Waktu Penelitian

Waktu yang digunakan peneliti untuk penelitian ini dilaksanakan sejak tanggal dikeluarkannya izin penelitian dalam kurun waktu kurang lebih 2 (dua) bulan, yakni 1 bulan digunakan untuk pengambilan sampel dan pengumpulan data yang dilakukan dengan uji laboratorium, dan 1 bulan digunakan untuk proses pengolahan data yang meliputi penyajian dalam bentuk Karya Tulis Ilmiah dan disertai proses bimbingan berlangsung. Penelitian diperkirakan akan dimulai pada pertengahan bulan Maret 2022 dan selesai pada bulan April 2022.

3.2.2. Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Ma Chung, Jurusan Farmasi yang berlokasi di Villa Puncak Tidar Blok N-1, Doro, Karangwidoro, Kec. Dau, Kabupaten Malang, Jawa Timur 65151.

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) yang banyak ditanam oleh masyarakat dan digunakan sebagai penambah rasa dalam masakan.

3.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini berupa sampel tunggal yang harus memperhatikan beberapa kriteria sampel, yaitu sebagai berikut.

- a. Tanaman belimbing wuluh yang sudah berumur minimal 3 tahun
- b. Buah Belimbing wuluh yang memiliki umur 65-90 hari setelah bunga mekar
- c. Buah Belimbing wuluh yang telah matang sempurna dan memiliki warna hijau mengkilat segar
- d. Buah Belimbing wuluh yang telah matang sempurna dan memiliki ciri fisik berbentuk lonjong berukuran sedang dengan panjang 5 – 10 cm dan tidak terdapat kecacatan
- e. Buah Belimbing wuluh yang matang sempurna ditandai dengan teksturnya yang kencang dan padat pada saat ditekan

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

3.4.1.1. Alat untuk Pembuatan *Infused Water* Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*)

- a. Botol Kaca
- b. Pisau
- c. Talenan
- d. Penyaring
- e. Neraca Digital
- f. Corong Kaca 75 mm
- g. Erlenmeyer 250 mL
- h. Botol Gelap

i. Refrigerator

3.4.1.2. Alat untuk Skrining Fitokimia

- a. Beaker glass 250 mL
- b. Beaker glass 100 mL
- c. Tabung reaksi
- d. Rak tabung reaksi
- e. Pipet tetes
- f. Pipet volume
- g. Bunsen
- h. Penjepit tabung reaksi
- i. Kaki Tiga
- j. Kassa Asbes

3.4.1.3. Alat untuk Uji Nilai Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

- a. Kuvet
- b. Spektrofotometer UV-Visible
- c. Neraca digital analitik
- d. Spatula
- e. Beaker glass 250 mL
- f. Labu takar 100 mL
- g. Labu takar 10 mL
- h. Kaca Arloji
- i. Corong gelas
- j. Pipet Volume
- k. Tabung Reaksi
- l. Rak tabung reaksi

3.4.2. Bahan

3.4.2.1. Bahan untuk Pembuatan *Infused Water* Buah Belimbing

Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn)

- a. Buah Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) yang telah matang
- b. Aquades
- c. Kertas Saring

3.4.2.2. Bahan untuk Skrining Fitokimia

- a. Aquades
- b. *Infused water* Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*)
- c. Padatan Raksa (II) Klorida (HgCl_2)
- d. Padatan Kalium Iodida (KI)
- e. Larutan pereaksi Dragendorf
- f. Larutan pereaksi Bouchardat
- g. Larutan Asam Klorida (HCl)
- h. Padatan Besi (III) Klorida (FeCl_3)
- i. Larutan Asam Asetat (CH_3COOH) glasial

3.4.2.3. Bahan untuk Uji Nilai Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

- a. Metanol PA
- b. Padatan 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH)
- c. Padatan Asam Askorbat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) PA

3.5. Variabel Penelitian

Variabel penelitian merupakan suatu sifat, nilai, atau atribut dari suatu orang, objek, atau kegiatan yang memiliki beberapa variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti yang tujuannya adalah untuk dipelajari dan kemudian diperoleh suatu penarikan kesimpulan (Sugiyono, 2015).

Variabel penelitian dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Variabel bebas (X) :
 - Kandungan senyawa fitokimia pada *infused water* Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) sebagai (\mathbf{X}_1)
 - Konsentrasi *infused water* Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) sebagai (\mathbf{X}_2)
2. Variabel terikat (Y) :
 - Keberadaan senyawa fitokimia alkanoid, flavonoid, tanin, triterpenoid, dan saponin sebagai (\mathbf{Y}_1)
 - Nilai aktivitas antioksidan dalam IC_{50} sebagai (\mathbf{Y}_2)

3. Variabel kontrol :

- Metode ekstraksi yang digunakan
- Jenis pelarut yang digunakan untuk ekstraksi
- Volume pelarut untuk pengujian antioksidan metode DPPH

3.6. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel adalah perumusan pengertian dari variabel yang dipakai dalam penelitian sebagai pegangan dalam pengumpulan data. Definisi operasional variabel berfungsi untuk mengarahkan kepada sistem pengukuran dari variabel yang bersangkutan serta pengembangan untuk suatu instrumen.

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Keberadaan senyawa fitokimia alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid, dan saponin	Ada atau tidaknya senyawa fitokimia alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid, dan saponin yang terdeteksi pada <i>infused water</i> Buah Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> Linn)	Hasil kualitatif dari skrining fitokimia	<ul style="list-style-type: none"> • (+) apabila terbentuk warna atau endapan yang sesuai dengan indikasi positif tiap senyawa fitokimia • (-) apabila terbentuk warna atau endapan yang sesuai dengan indikasi positif tiap senyawa fitokimia 	Nominal
Nilai aktivitas antioksidan	Nilai aktivitas antioksidan yang ditunjukkan melalui nilai <i>Inhibition Concentration</i> 50% (IC ₅₀) melalui	Hasil Absorbansi dari pengukuran menggunakan Spektrofotometer UV-Visible	Konsentrasi IC ₅₀ untuk setiap variasi konsentrasi <i>infused water</i> buah Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa</i>	Rasio

perbandingan dengan standar antioksidan	<i>bilimbi Linn</i>) yang dinyatakan dalam satuan mg/L atau ppm
---	--

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Prosedur Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) yang dipanen di daerah Kota Kediri, Jawa Timur. Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) yang matang sempurna dalam waktu 65-90 hari terhitung sejak bunga mekar.

Pengambilan sampel buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) memperhatikan kualitasnya yang bergantung pada tingkat kematangan yang sempurna. Buah Belimbing Wuluh yang matang sempurna ditandai dengan bentuknya yang lonjong berukuran sedang dengan panjang sekitar 5 – 10 cm, halus dan tidak terdapat kecacatan. Selain itu, buah belimbing yang matang sempurna berwarna hijau mengkilat segar.

Sampel Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) yang akan dianalisis dipanen dalam jangka waktu yang berdekatan dengan waktu analisis. Sebelum proses analisis, buah Belimbing Wuluh dicelupkan ke dalam air es untuk menjaga kesegarannya. Pengambilan sampel dilakukan pada akhir bulan Maret 2022.

3.7.2. Prosedur Pembuatan *Infused Water* Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*)

- a. Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) yang dipanen sesuai dengan kriteria yang telah disebutkan sebelumnya
- b. Dilakukan sortasi basah untuk menghilangkan kotoran yang terbawa oleh buah Belimbing Wuluh
- c. Dilakukan pencucian satu per satu pada buah Belimbing Wuluh dan pencucian dilakukan berulang kali kemudian ditiriskan menggunakan penyaring

- d. Bagian ujung dan pangkal buah Belimbing Wuluh dibuang dengan cara dipotong
- e. Daging buah Belimbing Wuluh dirajang dengan ketebalan $\pm 0,2$ cm
- f. Daging buah Belimbing Wuluh ditimbang sebanyak 200 gram dan dimasukkan dalam botol kaca yang sebelumnya telah dicuci bersih dan dibilas menggunakan aquades
- g. Ditambahkan aquades sebanyak 200 mL ke dalam botol yang sama. Rasio bahan dan pelarut adalah (1:1) gram / mL
- h. Botol ditutup rapat dan ditempatkan di dalam *refrigerator* selama 6 jam
- i. Setelah 6 jam, dilakukan filtrasi untuk mendapatkan filtrat *infused water* Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) (Munadia & Vonna, 2021).

3.7.3. Prosedur Skrining Fitokimia

3.7.3.1. Uji Alkaloid

- a. Pembuatan larutan HCl 2N dilakukan dengan mengambil HCl pekat 38% dipipet sebanyak 1,66 mL dan dimasukkan dalam beaker glass yang telah berisi 2 mL aquades secara perlahan. Diaduk sebentar hingga homogen. Dimasukkan dalam labu takar 10 mL dan ditandabatkan dengan aquades. Dikocok hingga homogen
- b. Pembuatan larutan Mayer dilakukan dengan mengambil 1,5 gram HgCl_2 dan dilarutkan dalam 60 mL aquades. Kemudian diambil KI sebanyak 5 gram dan dilarutkan ke dalam 10 mL aquades pada beaker glass lainnya. Kedua larutan tersebut dicampurkan dan diencerkan menggunakan aquades hingga mencapai tanda batas 100 mL
- c. Filtrat *infused water* diambil sebanyak 2 mL dan diuapkan di atas cawan porselein
- d. Residu kemudian ditambahkan larutan HCl 2 N sebanyak 5 mL

- e. Filtrat kemudian dibagi dalam 4 tabung reaksi berbeda
- f. Tabung reaksi A sebagai blanko yaitu dengan ditambahkan 3 tetes larutan HCl 2 N
- g. Tabung reaksi B ditambahkan 3 tetes larutan pereaksi Mayer, hasil positif apabila terbentuk endapan putih atau kuning
- h. Tabung reaksi C ditambahkan 3 tetes larutan pereaksi Dragendorf, hasil positif apabila terbentuk endapan cokelat
- i. Tabung reaksi D ditambahkan 3 tetes larutan pereaksi Bouchardat, hasil positif apabila terbentuk endapan cokelat kemerahan hingga cokelat
- j. Sampel diduga positif mengandung senyawa alkaloid apabila diperoleh hasil positif 2 dari 3 tabung reaksi.
(Farnsworth, 1966).

3.7.3.2. Uji Flavonoid

Filtrat *infused water* Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) diambil sebanyak 3 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan serbuk Magnesium sebanyak 50 mg. Ditambahkan larutan HCl pekat sebanyak 5 tetes dan dihomogenkan. Sampel diduga positif mengandung senyawa flavonoid apabila terjadi perubahan warna larutan menjadi warna merah, kuning, atau jingga (Harborne, 1987).

3.7.3.3. Uji Tanin

Filtrat *infused water* Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) diambil sebanyak 1 mL dan kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan pereaksi FeCl₃ 10%. Sampel diduga positif mengandung senyawa tanin apabila terjadi perubahan warna larutan menjadi warna biru tua atau hitam kehijauan (Jones *et al.*, 2006).

3.7.3.4. Uji Steroid dan Triterpenoid

Filtrat *infused water* Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) diambil sebanyak 2 mL. Kemudian ditambahkan aquades yang telah dipanaskan sebanyak 8 mL. Larutan kemudian disaring dan filtratnya

dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan reagen Bouchardat sebanyak 3 (tiga) tetes. Sampel diduga positif mengandung senyawa steroid apabila terjadi perubahan warna larutan menjadi warna biru atau hijau, sedangkan untuk senyawa triterpenoid diduga positif apabila terjadi perubahan warna menjadi warna merah atau ungu (Harborne, 1987).

3.7.4.5. Uji Saponin

Filtrat *infused water* Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) diambil sebanyak 2-3 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan aquades yang telah dipanaskan sebanyak 10 ml dan kemudian didinginkan. Dilakukan pengocokan kuat selama 10 detik. Hasil positif mengandung saponin apabila terbentuk buih yang mantap setinggi 1–10 cm selama 10 menit. Dilakukan penambahan 1 tetes HCl 2N dan buih tidak hilang (Depkes RI, 1995).

3.7.4. Prosedur Uji Nilai Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

Sebelum dilakukan proses analisis, seluruh alat yang digunakan dibilas menggunakan metanol PA secara menyeluruh dan kemudian dilakukan penyekaan menggunakan kertas tisu hingga kering.

3.7.4.1. Prosedur Pembuatan Larutan Uji

- a. Filtrat *infused water* Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL untuk dilarutkan menggunakan metanol PA. Dihasilkan larutan induk sampel dengan konsentrasi 100 ppm
- b. Dilakukan pengenceran dengan mengambil larutan induk masing masing sebanyak 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; dan 1 mL dan dimasukkan dalam labu takar 10 mL yang berbeda
- c. dilarutkan menggunakan metanol PA hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Dipindahkan ke dalam botol vial yang telah ditutupi oleh *aluminium foil* dan diberi label (Cahyani, 2017).

3.7.4.2. Prosedur Pembuatan Larutan Standar Asam Askorbat

- a. Padatan asam askorbat ditimbang sebanyak 10 mg dengan penimbangan langsung dilakukan dalam labu takar 100 mL.
- b. Dilarutkan menggunakan pelarut metanol PA. Dihasilkan larutan induk asam askorbat dengan konsentrasi 100 ppm
- c. Dilakukan pengenceran dengan mengambil larutan induk masing masing sebanyak 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; dan 1 mL dan dimasukkan dalam labu takar 10 mL yang berbeda
- d. Dilarutkan menggunakan metanol PA hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Dipindahkan ke dalam botol vial yang telah ditutupi oleh *aluminium foil* dan diberi label (Cahyani, 2017).

3.7.4.3. Prosedur Pembuatan Larutan Induk DPPH

- a. Labu takar yang akan digunakan dibungkus dengan menggunakan *aluminium foil* hingga tertutup bagian bawahnya hingga bagian tanda batas
- b. Ditimbang padatan DPPH sebanyak 2,5 mg dengan penimbangan langsung dilakukan dalam labu takar 100 mL. Diperoleh larutan induk DPPH dengan konsentrasi 25 ppm
- c. Dilarutkan menggunakan pelarut metanol PA hingga mencapai tanda batas
- d. Dilakukan pengocokan hingga homogen. Pembuatan larutan dilakukan secara cepat dan harus menghindari cahaya

3.7.4.4. Prosedur Penentuan Nilai Absorbansi Larutan Uji dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

- a. Tiap larutan uji diambil sebanyak 2 mL dan dicampurkan dengan 2 mL larutan induk DPPH, dilakukan replikasi sebanyak 3 (tiga) kali
- b. Larutan standar asam askorbat diambil sebanyak 2 mL dan dicampurkan dengan 2 mL larutan induk DPPH
- c. Larutan campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan dalam keadaan gelap

- d. Larutan induk DPPH 25 ppm juga digunakan sebagai larutan kontrol untuk selanjutnya dilakukan pembacaan nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Visible
- e. Diukur nilai absorbansinya untuk setiap larutan uji menggunakan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 517 nm
- f. Dilakukan perhitungan untuk memperoleh nilai %inhibisi, persamaan regresi linear, dan nilai IC₅₀ (AOAC, 1970).

3.8. Pengolahan dan Penyajian Data

Setelah melakukan penelitian secara kualitatif dan kuantitatif, data yang terkumpul akan dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif sesuai dengan jenis pengujian yang telah dilakukan. Teknik analisis data serta penyajian data akan dilakukan sebagai berikut.

3.8.1. Hasil Data Skrining Fitokimia

Analisis data dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan model induktif. Hasil skrining fitokimia (data) akan dibandingkan dengan teori yang ada sehingga dapat dihasilkan kesimpulan. Kemudian, data yang telah dianalisis disajikan dalam bentuk tabel klasifikasi satu arah. Data ini kemudian akan menjadi gambaran dalam melakukan analisis data kuantitatif dalam pengujian nilai aktivitas antioksidan.

Sampel diduga positif mengandung senyawa steroid apabila terjadi perubahan warna larutan menjadi warna biru atau hijau, sedangkan untuk senyawa triterpenoid diduga positif apabila terjadi perubahan warna menjadi warna merah atau ungu

Hasil dari skrining fitokimia dapat diinterpretasikan sebagai berikut.

Tabel 3. 2 Hasil Pengujian Skrining Fitokimia

No.	Jenis Penngujian	Pereaksi	Pengamatan Reaksi Positif	Pengamatan Reaksi Negatif
1.	Uji Alkaloid	Mayer	Terbentuk endapan putih pada larutan	Larutan tetap jernih tidak terbentuk endapan putih
		Bouchardat	Terbentuk endapan coklat kemerahan hingga coklat	Tidak terbentuk endapan coklat kemerahan hingga coklat

			kehitaman pada larutan	kehitaman pada larutan
		Dragendorf	Terbentuk endapan coklat kemerahan pada larutan Terjadi perubahan warna larutan dari jernih menjadi warna merah, jingga, atau jingga Terjadi perubahan larutan menjadi warna biru tua atau hitam kehijauan	Tidak terbentuk endapan coklat kemerahan pada larutan Tidak terjadi perubahan warna pada larutan Larutan tetap jernih tidak terjadi perubahan
2.	Uji Flavonoid	HCl + Mg		
3.	Uji Tanin	FeCl ₃ 10%		
Steroid				
			Terjadi perubahan warna larutan menjadi warna biru atau hijau	Tidak terjadi perubahan warna pada larutan
4.	Uji Steroid dan Triterpenoid	CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄		
Triterpenoid				
			Terjadi perubahan warna larutan menjadi warna merah atau ungu	Tidak terjadi perubahan warna pada larutan
5.	Uji Saponin	Aquades panas + HCl	Terbentuk buih konstan setinggi 1-10 cm	Terbentuk buih namun cepat hilang

3.8.2. Hasil Data Nilai Aktivitas Antioksidan

Perhitungan nilai aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode uji DPPH dapat dilakukan dengan menghitung terlebih dahulu nilai %inhibisi atau %penghambatan terhadap radikal bebas DPPH dengan data absorbansi spektrofotometri uv-visible dengan rumus sebagai berikut :

$$\%Antioksidan = \frac{A-Ac}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A_c = Nilai absorbansi sampel

A = Nilai Absorbansi kontrol

Selanjutnya, hasil %inhibisi untuk setiap konsentrasi yang berbeda diolah dalam bentuk persamaan regresi linear dengan nilai %inhibisi sebagai data (Y) dan konsentrasi larutan uji sebagai data (X). Setelah persamaan regresi linear diperoleh, selanjutnya dilakukan perhitungan nilai IC_{50} dengan memasukkan nilai (X) sebagai nilai IC_{50} , sedangkan nilai (Y) diganti dengan nilai 50.

Hasil nilai IC_{50} kemudian dianalisis untuk dihitung nilai rata-ratanya untuk setiap konsentrasi larutan uji yang berbeda. Dilakukan analisis untuk mengetahui manakah konsentrasi optimum yang dapat menghasilkan nilai IC_{50} paling rendah atau dapat dikatakan memiliki nilai aktivitas antioksidan paling tinggi. Nilai IC_{50} digunakan sebagai faktor penentu penggolongan nilai antioksidan tersebut apakah tinggi, sedang, atau lemah.

Analisis data yang telah diperoleh dari pengujian nilai aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan statistik inferensial. Data yang diperoleh nantinya akan digeneralisasikan untuk menarik kesimpulan dari populasi yang ada. Model analisis data menggunakan model induktif, dimana data akhir berupa nilai IC_{50} dari beberapa konsentrasi yang berbeda dari *infused water* Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) akan ditarik kesimpulan berdasarkan standar penggolongan intensitas antioksidan yang ada.

Dari hasil analisis data yang telah diperoleh kemudian akan disajikan dalam bentuk diagram garis (grafik), yang tujuannya adalah untuk menunjukkan nilai aktivitas antioksidan dalam bentuk IC_{50} dari beberapa konsentrasi yang berbeda dari *infused water* Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) yang telah diuji. Nilai IC_{50} yang telah didapatkan kemudian diinterpretasikan dengan menggunakan standar penggolongan sifat

antioksidan yang telah ada. Interpretasi yang akan digunakan yaitu sebagai berikut.

Tabel 3. 3 Interpretasi Nilai Aktivitas Antioksidan IC50 terhadap Sifat Antioksidan

No.	Nilai IC50 (ppm)	Sifat Antioksidan
1.	< 50	Sangat Kuat
2.	50 – 100	Kuat
3.	101 – 150	Sedang
4.	151 – 200	Lemah
5.	> 200	Sangat Lemah

(Molyneux, 2004)