

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Objek Penelitian

Objek dari penelitian ini adalah penetapan kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

3.2 Sampel dan Teknik Sampling

Daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang didapat di Margadana, kota Tegal dijadikan sebagai sampel dalam penelitian ini. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah acak sederhana (*random sampling*). Metode ini merupakan salah satu teknik yang paling sering digunakan dalam penelitian karena prosesnya relatif sederhana dan objektif. Sampel dipilih secara acak dari seluruh populasi, sehingga setiap anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk dipilih, dengan tujuan mengurangi potensi kesalahan (Sugiyono, 2015).

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah faktor dalam sebuah penelitian yang dapat diubah atau dimanipulasi oleh peneliti. Dalam eksperimen, variabel bebas adalah variabel yang dianggap sebagai penyebab perubahan pada variabel lainnya (variabel terikat) (Sugiyono, 2015). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang didapat di Margadana, kota Tegal.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel yang muncul akibat keberadaan variabel bebas dikenal sebagai variabel terikat (Sugiyono, 2015). Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan pada daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.)

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol adalah variabel yang diukur dan diamati hasilnya berdasarkan pengaruh variabel bebas (Sugiyono, 2015). Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi secara maserasi, jenis pelarut, metode penentuan kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan.

3.4 Teknik Pengumpulan Data

3.4.1 Cara pengambilan data

1. Jenis data yang digunakan bersifat kualitatif dengan menggunakan regensia laboratorium dan kuantitatif dengan menggunakan pengambilan data kolektif yang dianalisis dengan instrumen laboratorium. Pada penetapan kadar flavonoid total, data dianalisis menggunakan regresi linier antara konsentrasi dan absorbansi berdasarkan kurva baku. Sedangkan pada uji aktivitas antioksidan metode DPPH, data dianalisis menggunakan regresi linier antara log konsentrasi dan probit untuk menentukan nilai IC_{50} menggunakan *software* komputer.
2. Metode pengumpulan data menggunakan eksperimen Laboratorium Farmasi di Universitas Harkat Negeri.

3.4.2 Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi timbangan, oven, sendok tanduk, ayakan no 100 mesh, mikroskop, objek glass, *deck glass*, cover glass, mikro pipet, kaca arloji, corong, gelasukur, cawan, tabung reaksi, penjepit kayu, batang pengaduk, bunsen dan kaki tiga, botol kaca, plat tetes, kertas pH, *beaker glass*, stirer, spektrofotometri UV-Vis.

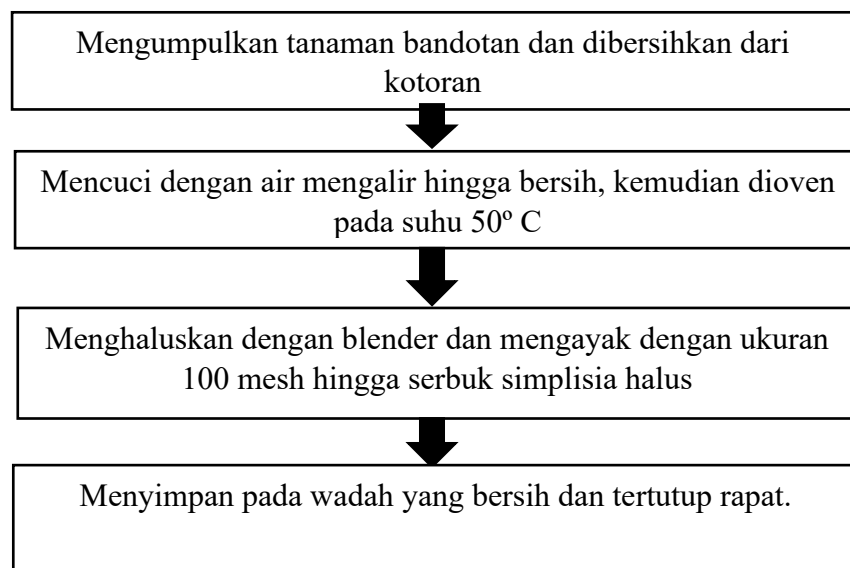
2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi aquades, metanol, etanol 96%, kertas saring, FeCl_3 , H_2SO_4 , NaOH, asam asetat, reagen mayer, reagen buyer, dragendorff, kalium iodida, amonia, pita mg, HCl pekat, asam anhidrat, kuersetin, AlCl, Na_2CO_3 , Vitamin C, DPPH (*kristal 2,2 – difenil-1-picrylhydrazyl*).

3.4.3 Cara Kerja

1. Pembuatan serbuk simplisia

Mengumpulkan tanaman bandotan, cuci dibawah air mengalir hingga bersih, lalu oven pada suhu 60°C . Setelah simplisia kering, kemudian diblender dan diayak dengan ayakan 100 mesh hingga didapat serbuk simplisia yang halus. Serbuk yang dihasilkan disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

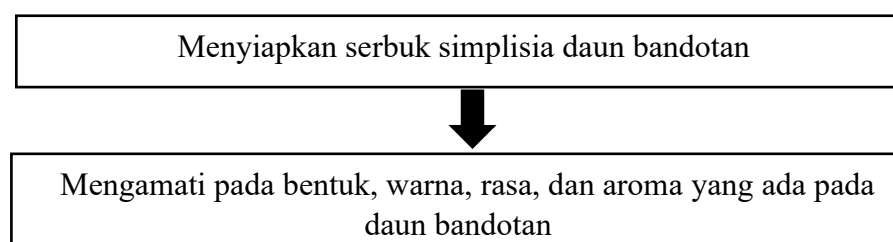


Gambar 3. 2 Skema Pembuatan Serbuk Simplisia

(Anisa *et al.*, 2022).

2. Uji Makroskopik

Pengamatan secara makroskopik pada sampel daun bandotan yang digunakan memuat pengamatan pada bentuk, warna, rasa, dan aroma dari sampel yang dipilih.



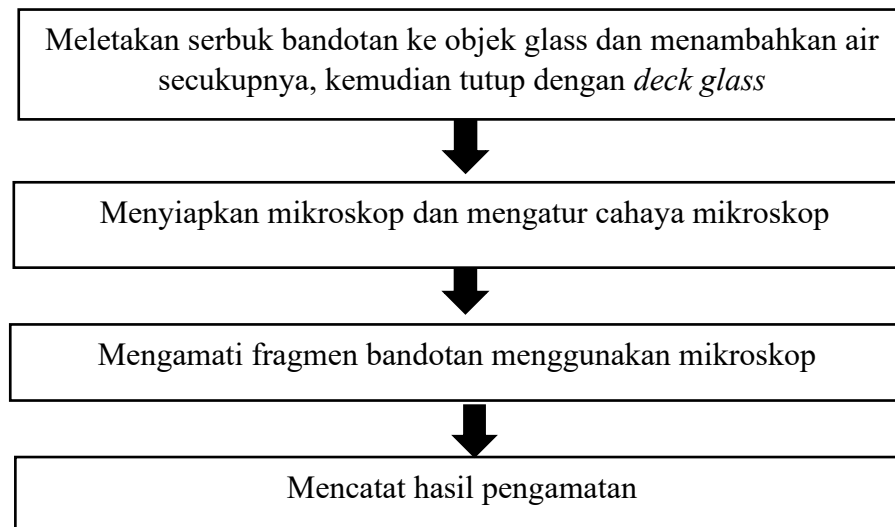
Gambar 3.2 Skema Uji Makroskopis

(Anisa *et al.*, 2022)

3. Uji Mikroskopik

Uji mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia dan diamati fragmen daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.). Serbuk daun bandotan

diletakan diatas objek glass secukupnya kemudian ditetesi air secukupnya (1-2 tetes), tutup dengan *deck glass* dan amati dengan mikroskop.

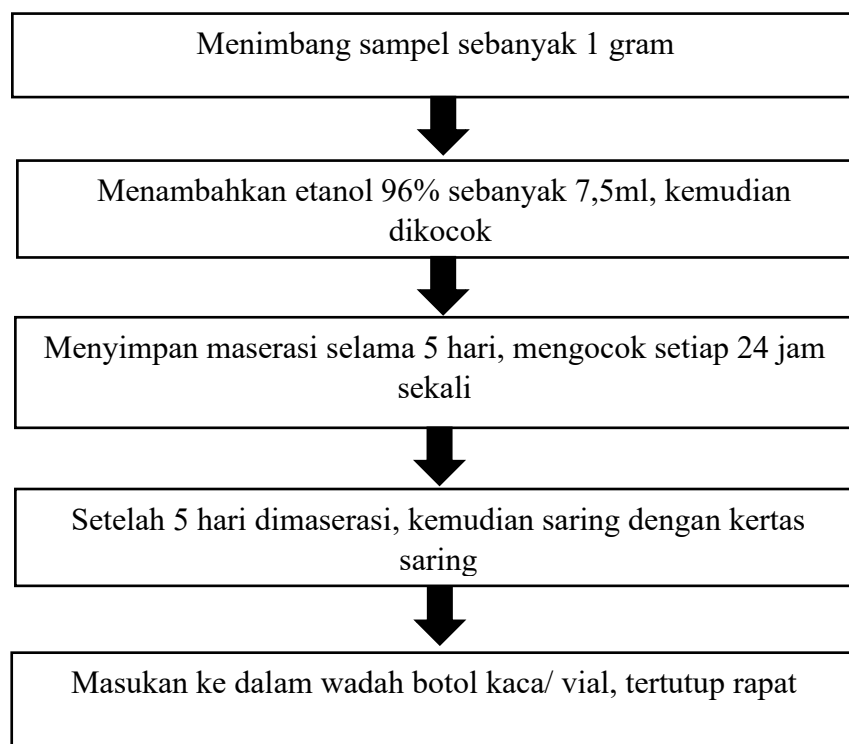


Gambar 3.3 Skema uji mikroskopis

(Utami *et al.*, 2020)

4. Pembuatan ekstrak etanol daun bandotan

Penelitian ini menggunakan simplisia daun bandotan sebanyak 1 gram, kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi. Menimbang 1 gram serbuk simplisia, tambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 7,5 ml kemudian dikocok. Setelah lima hari maserasi, saring menggunakan kertas saring.

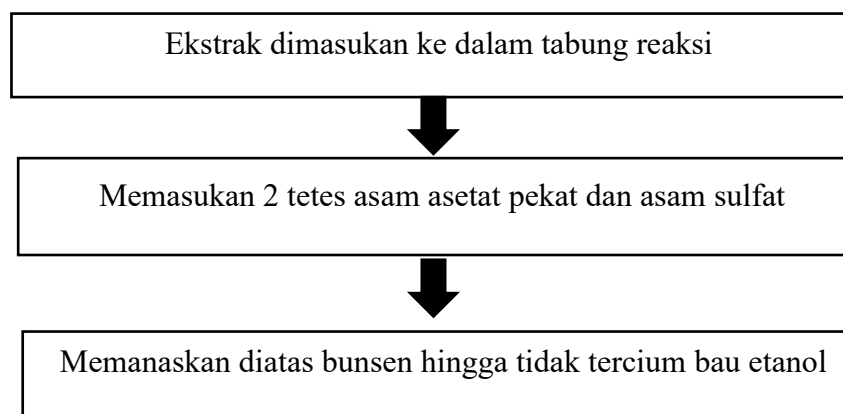


Gambar 3. 4 Skema pembuatan ekstrak etanol daun bandotan
(Sirumapea *et al.*, 2021)

5. Skrining fitokimia

a. Uji bebas etanol

Ekstrak dicampurkan dengan H_2SO_4 pekat dan CH_3COOH dalam melakukan uji bebas pelarut etanol. Jika ekstrak tidak menghasilkan bau ester khas etanol, dapat dinyatakan bahwa ekstrak tersebut bebas dari pelarut etanol. Uji ini dilakukan untuk memastikan bahwa residu pelarut telah digunakan yaitu etanol 96% sudah sepenuhnya dihilangkan dari ekstrak yang didapat.

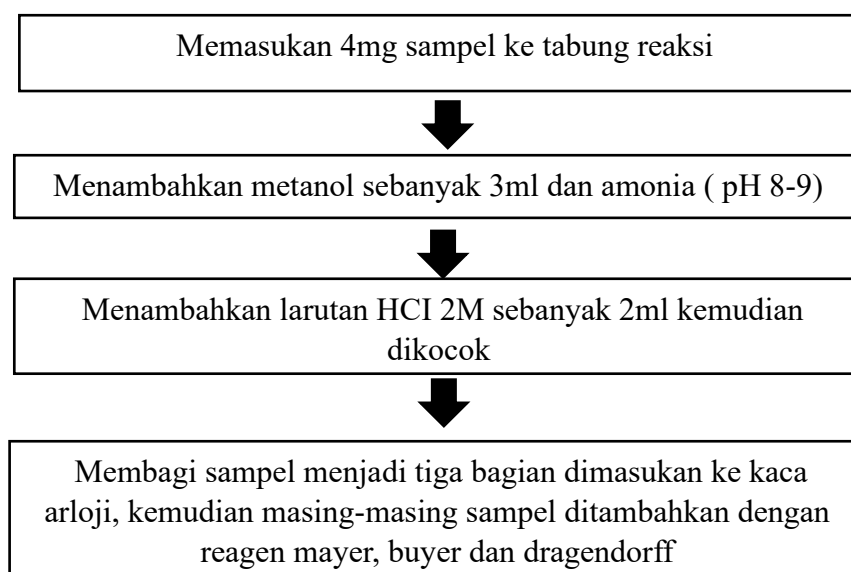


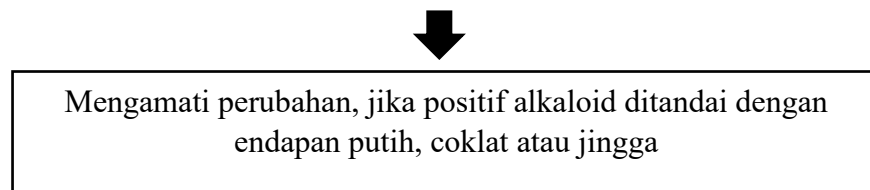
Gambar 3.5 Skema uji bebas etanol

(Fatikha *et al.*, 2024)

b. Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara memasukan empat miligram sampel, tambahkan dengan metanol (3ml) dan amonia (pH 8-9) kemudian disaring. Tambahkan larutan HCl₂M sebanyak (2ml) kemudian dikocok. Selanjutnya, sampel dibagi menjadi tiga bagian untuk direaksikan masing-masing dengan reagen mayer, buyer, dan dragendorff. Hasil uji positif untuk alkaloid jika terbentuk endapan putih, coklat, atau jingga.



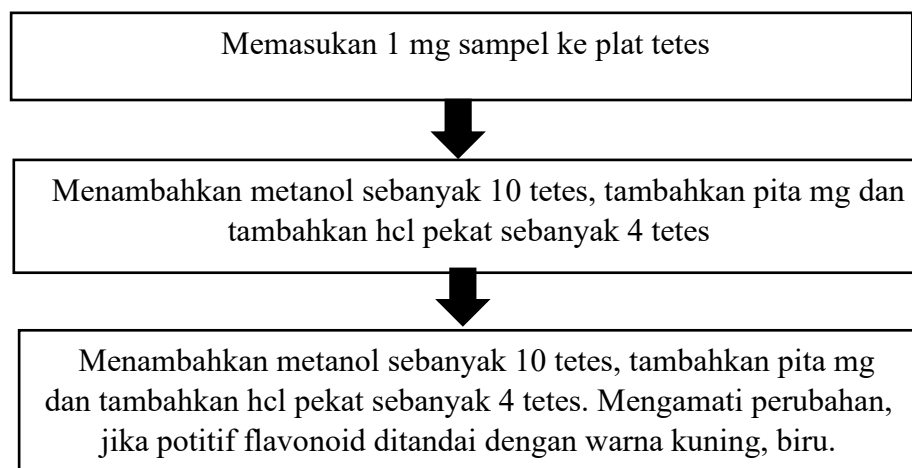


Gambar 3.6 Skema Uji Alkaloid

(Fatikha *et al.*, 2024)

c. Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara memasukan satu miligram sampel, tambahkan metanol (10 tetes) dan pita mg, kemudian tambahkan hcl pekat (4 tetes), hasil positif flavonoid ditandai perubahan warna kuning, biru atau jingga.

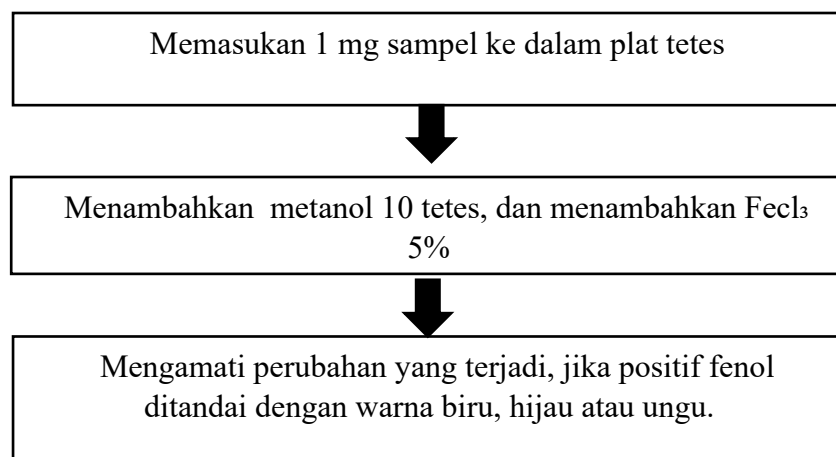


Gambar 3.7 Skema uji flavonoid

(Safrida dan Rahmah, 2021)

d. Uji fenol

Uji fenol dilakukan dengan cara memasukan sampel sebanyak (1mg), menambahkan metanol (10 tetes), menambahkan FeCl_3 5%. Jika positif fenol ditandai dengan warna biru, hijau atau ungu.

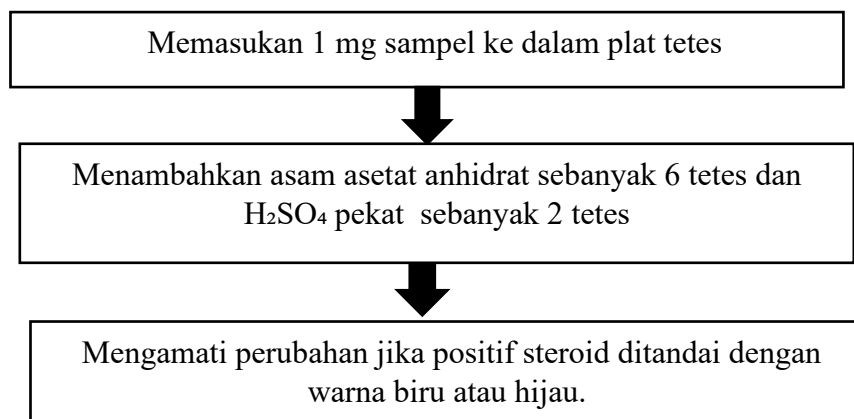


Gambar 3.8 Skema uji fenol

(Safrida dan Rahmah, 2021)

e. Uji Steroid

Uji steroid dilakukan dengan cara memasukan satu miligram sampel ke tabung raksi, tambahkan asam asetat anhidrat (6 tetes), tambahkan H₂SO₄ pekat (2 tetes). Terjadi warna biru, hijau jika positif steroid.

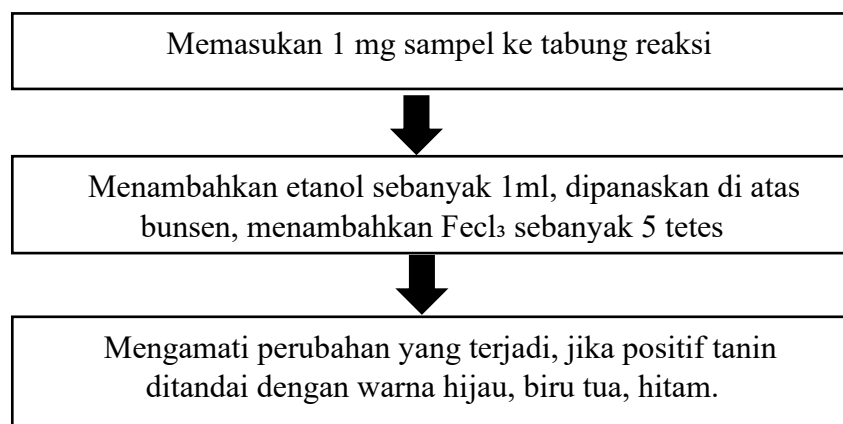


Gambar 3.9 Skema uji steroid

(Safrida dan Rahmah, 2021)

f. Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan satu miligram sampel dilarutkan dengan satu mililiter etanol, dipanaskan diatas bunsen, tambahkan FeCl_3 (5 tetes). Terjadi warna hijau, biru tua, hitam jika positif adanya tanin.

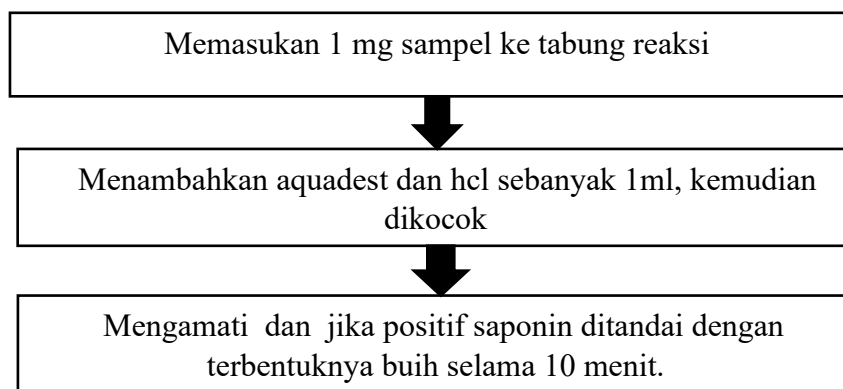


Gambar 3.10 Skema uji tanin

(Batubara *et al.*, 2025)

g. Uji saponin

Uji saponin dilakukan dengan memasukkan sampel sebanyak satu miligram ke dalam tabung reaksi, menambahkan aquadest dan hcl sebanyak satu mililiter, kemudian dikocok. Uji positif saponin ditandai dengan munculnya buih selama 10 menit.



Gambar 3.11 Skema uji saponin

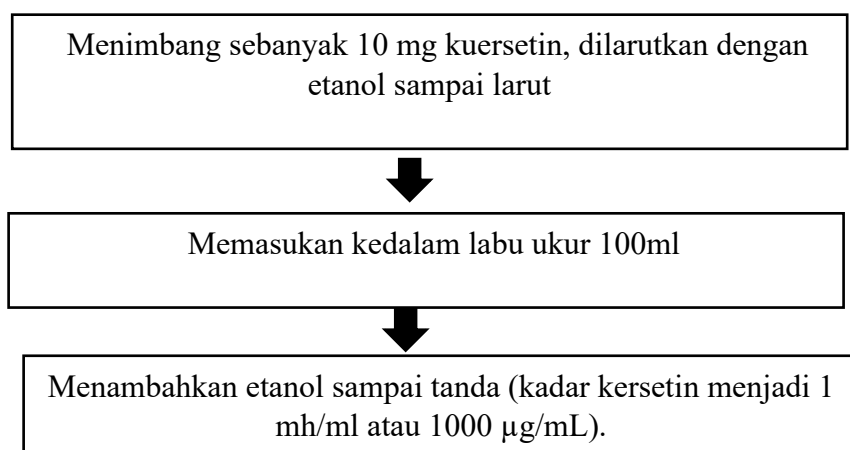
(Safrida dan Rahmah, 2021)

6. Penentuan kadar flavonoid

a. Pembuatan larutan induk kuersetin

1) Pembuatan larutan induk kuersetin (100 ppm)

Menimbang sebanyak 10 mg kuersetin, dilarutkan dengan etanol hingga larut, kemudian memasukan ke dalam labu ukur 100 ml, tambahkan etanol hingga tanda batas.

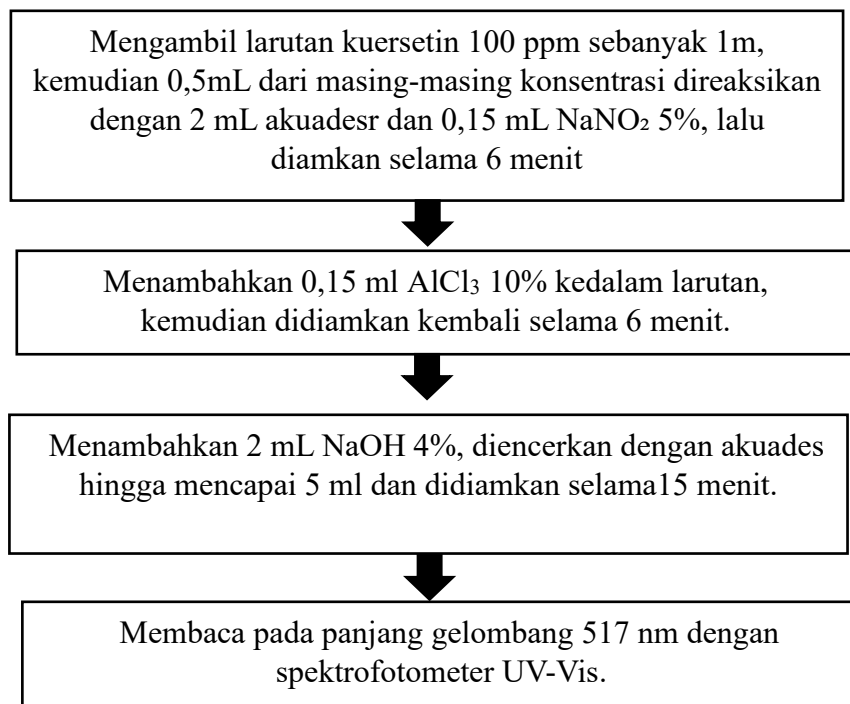


Gambar 3.12 Skema pembuatan larutan induk kuersetin
(Effendy *et al.*, 2024)

2) Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan kuersetin 100 ppm dipipet ke dalam 1 mL. Selanjutnya, 0,5 mL diambil dari masing-masing konsentrasi larutan untuk direaksikan dengan 2 mL aquadest dan 0,15 mL NaNO_2 5%, kemudian didiamkan selama enam menit. Larutan kemudian dicampur dengan 0,15 mL AlCl_3 10% dan didiamkan selama 6 menit lagi. Larutan kemudian direaksikan dengan 2 mL NaOH 4%, diencerkan dengan aquadest hingga volume total 5 mL dan

dibiarkan selama 15 menit. Lakukan pembacaan pada panjang gelombang 300-510 nm dengan spektrofotometri UV-Vis.

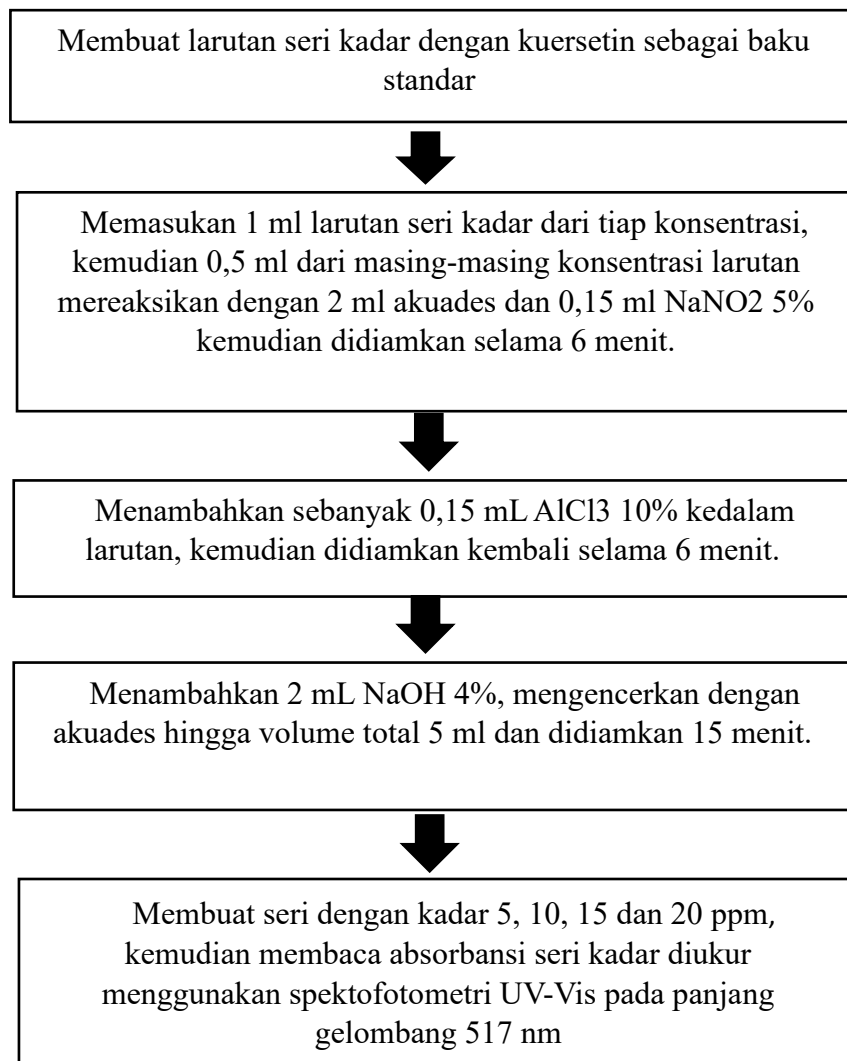


Gambar 3.13 Skema penentuan panjang gelombang maksimum (Effendy *et al.*, 2024)

b. Pembuatan kurva baku kuersetin

Larutan seri kadar kuersetin sebagai baku standar pada konsentrasi 50, 100, 150, 20, 300 dan 350 ppm. Dari setiap konsentrasi, 1 mL larutan diambil, kemudian 0,5 mL dipipet untuk direaksikan dengan 2 mL air suling dan 0,15 mL NaNO₂ 5% dan didiamkan selama 6 menit. Selanjutnya, 0,15 mL AlCl₃ 10% ditambahkan ke dalam larutan dan didiamkan selama 6 menit lagi. Pada tahap akhir, larutan direaksikan dengan 2 mL NaOH 4%, kemudian diencerkan dengan aquadest hingga volume total 5 mL dan didiamkan selama 15 menit dan didiamkan 15 menit.

Absorbansi seri kadar diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

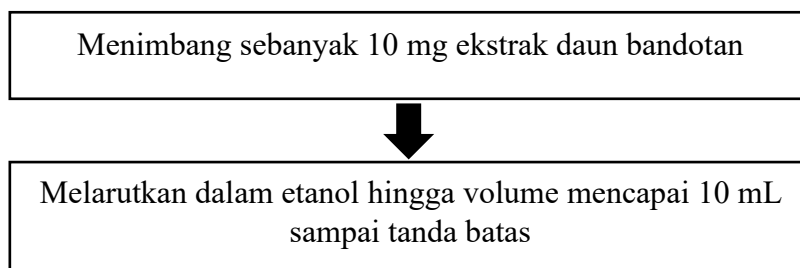


Gambar 3.14 Skema pembuatan kurva baku kuersetin
(Effendy *et al.*, 2024)

c. Penentuan Senyawa Flavonoid Total

1) Pembuatan larutan induk ekstrak

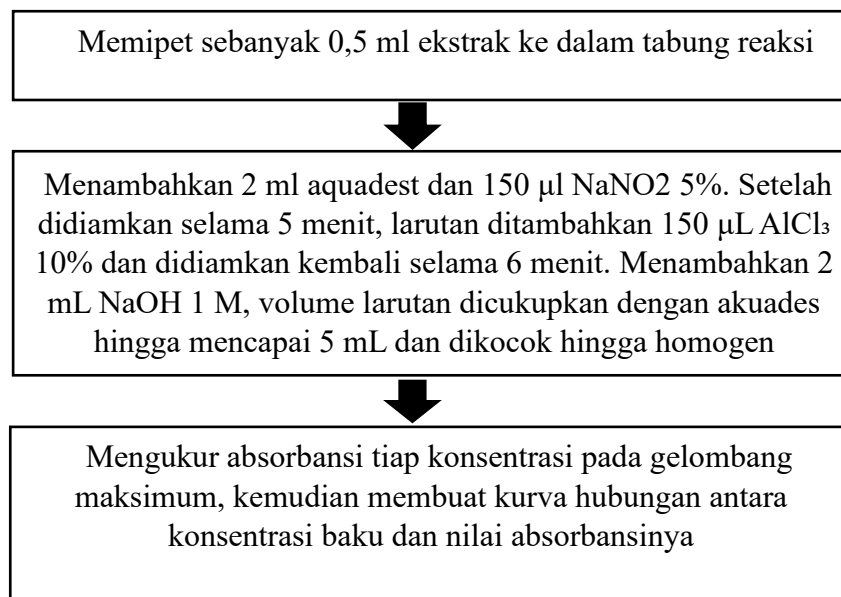
Ekstrak daun bandotan ditimbang sebanyak 10 mg, dilarutkan dalam 10 ml etanol, volumenya dicukupkan sampai tanda batas.



Gambar 3.15 Skema pembuatan larutan induk ekstrak
(Effendy *et al.*, 2024)

2) Penentuan senyawa flavonoid total

Sebanyak 0,5 mL larutan standar ekstrak dipipet kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 mL aquadest dan dihomogenkan. Setelah itu, 150 μL NaNO_2 5% ditambahkan dan larutan dibiarkan selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan 150 μL AlCl_3 10% dan didiamkan kembali selama 6 menit. Tahap berikutnya, 2 mL NaOH 1 M dimasukkan ke dalam campuran, lalu volume larutan disesuaikan dengan aquadest hingga mencapai 5 mL. Larutan dikocok hingga homogen, kemudian absorbansi masing-masing konsentrasi diukur pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh untuk menyusun kurva hubungan antara konsentrasi baku dan nilai absorbansinya.



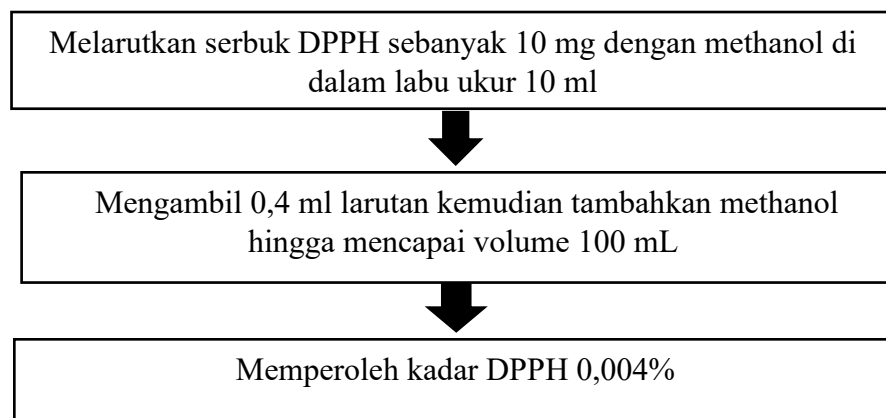
Gambar 3.16 Skema penentuan flavonoid total

(Effendy *et al.*, 2024)

7. Penentuan IC_{50}

a. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH 1000 ppm disiapkan dengan menimbang 10 mg bubuk DPPH, kemudian melarutkannya menggunakan metanol dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas. Dari larutan stok ini, larutan DPPH 40 ppm disiapkan dengan mengambil 0,4 mL larutan tersebut dan mengencerkannya dengan metanol dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas. Pengenceran ini menghasilkan larutan DPPH dengan konsentrasi akhir 0,004%.

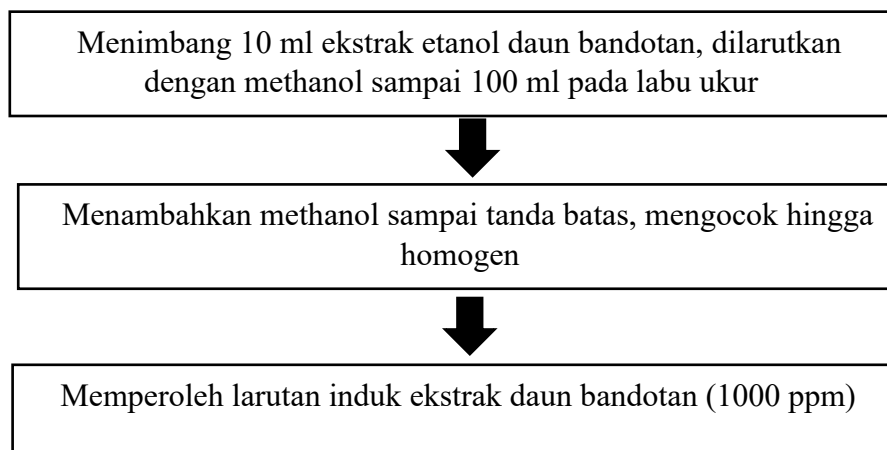


Gambar 3.17 Skema pembuatan larutan DPPH

(Nurchahyo *et al.*, 2022)

b. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Daun Bandotan (1000 ppm)

Menimbang 10 mililiter ekstrak daun bandotan dan dilarutkan dalam 100 mililiter metanol dalam labu volumetrik. Tambahkan metanol secukupnya dan aduk hingga tercampur rata.

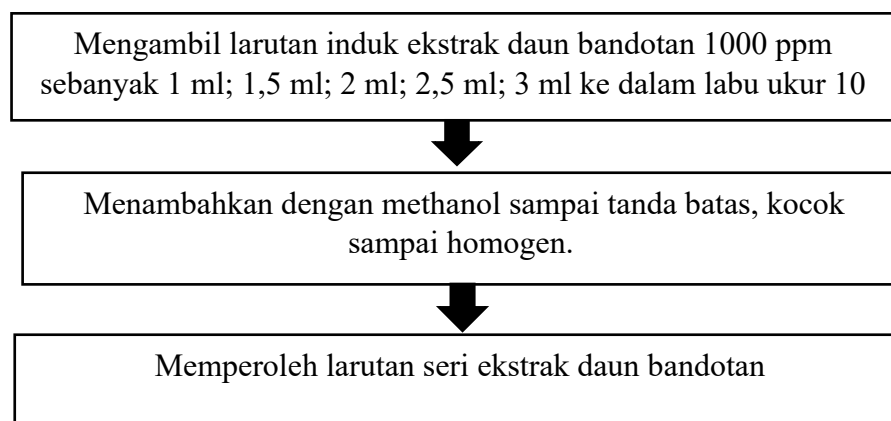


Gambar 3.18 Skema pembuatan larutan induk ekstrak daun bandotan (1000 ppm)

(Susiloningrum, 2021)

c. Pembuatan Larutan Seri Ekstrak Daun Bandotan (100, 150, 200, 250, 300 ppm).

Larutan induk ekstrak daun bandotan dengan konsentrasi 1000 ppm dipipet ke dalam labu ukur 10 mL dengan volume masing-masing 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, 2,5 mL, dan 3 mL. Selanjutnya, metanol ditambahkan hingga tanda batas, dan larutan dikocok hingga homogen.

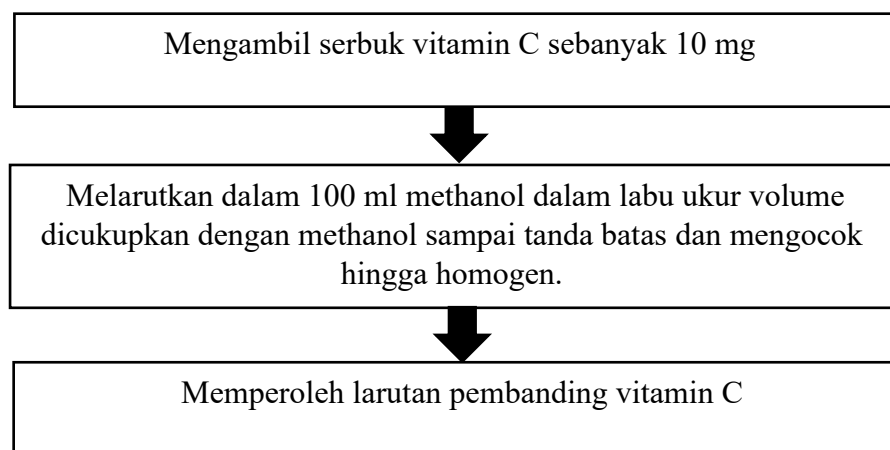


Gambar 3.19 Skema pembuatan larutan seri daun bandotan

(Susiloningrum, 2021)

d. Pembuatan Larutan Pembanding vitamin C (1000 ppm)

Serbuk vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam metanol didalam labu ukur 100 mL. Metanol ditambahkan ke dalam larutan hingga mencapai batas volume, kemudian dikocok hingga merata.

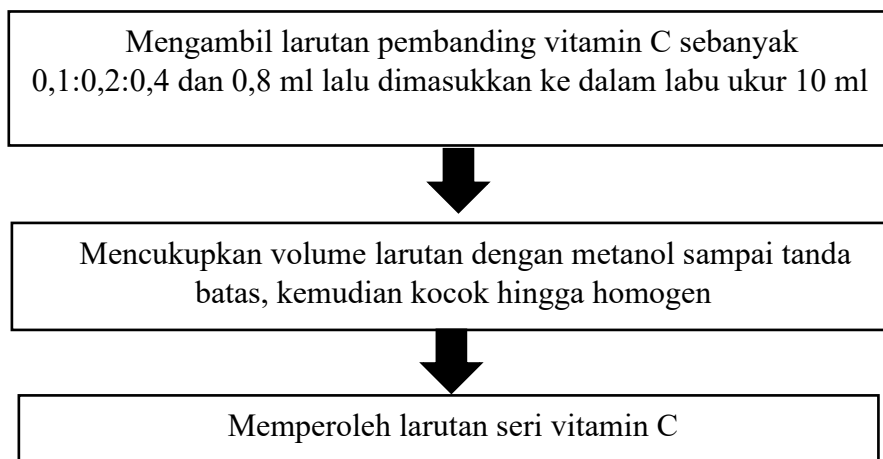


Gambar 3.20 Skema pembuatan larutan pembanding vitamin C

(Susiloningrum, 2021)

e. Pembuatan Larutan Seri Vitamin C (10,20,40,80 ppm)

Larutan pembanding vitamin C masing masing dipipet sebanyak 0,1:0,2:0,4 dan 0,8 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Kemudian, menambahkan metanol hingga tanda batas, dan larutan dikocok hingga homogen.

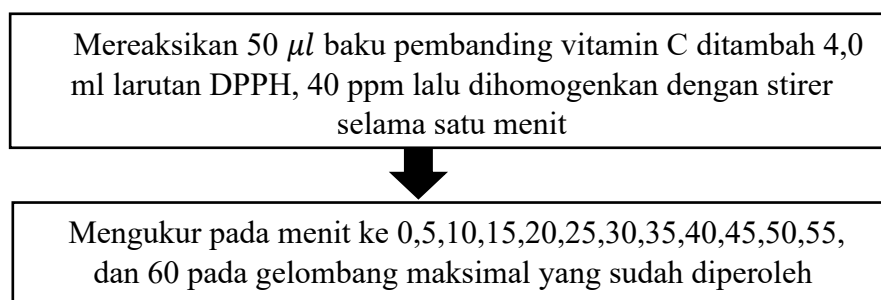


Gambar 3.21 Skema pembuatan larutan seri vitamin C

(Susiloningrum, 2021)

f. Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan mereaksikan 50 μL larutan baku pembanding vitamin C dengan 4,0 mL larutan DPPH 40 ppm. Larutan dihomogenkan menggunakan stirrer selama satu menit, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang sudah ditetapkan pada menit ke-0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60.

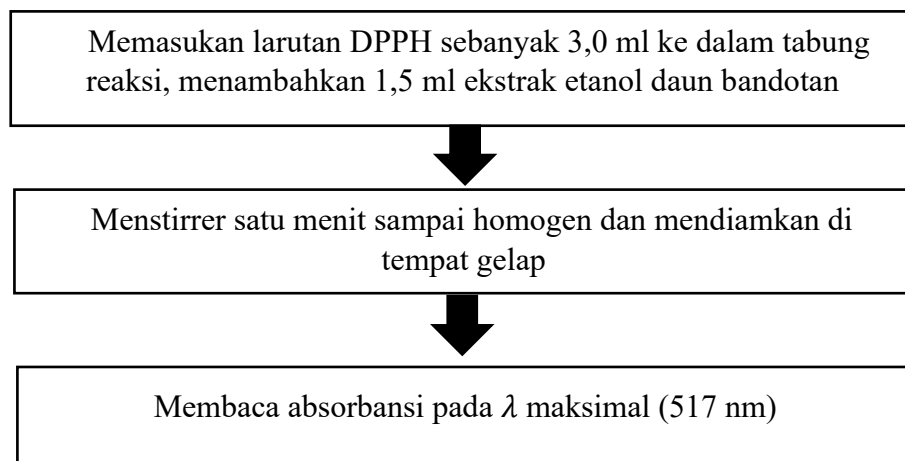


Gambar 3.22 Skema Penentuan *operating time*

(Susiloningrum, 2021)

g. Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 3,0 mL larutan DPPH ditambahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1,5 mL ekstrak etanol daun bandotan. Larutan dihomogenkan dengan stirrer selama satu menit, lalu diinkubasi di ruangan gelap pada suhu kamar selama tiga puluh menit. Setelah masa inkubasi, absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 3.23 Skema pengukuran aktifitas antioksidan

(Nurcahyo et al., 2022)

h. Analisis Data Aktifitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dinyatakan dengan nilai perendaman DPPH (% inhibisi). Semakin tinggi nilai perendamannya, semakin tinggi juga aktivitas antioksidan sampel. Selanjutnya, rumus berikut digunakan untuk menentukan persentase inhibisi DPPH ekstrak daun bandotan:

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

i. Perhitungan Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ diperoleh melalui analisis linier hubungan antara logaritma konsentrasi (log konsentrasi) dan nilai probit menggunakan regresi linier. Semakin kecil nilai IC₅₀, semakin rendah konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal DPPH. Persamaan

regresi linier dengan logaritma konsentrasi sampel pada sumbu x dan nilai probit pada sumbu y digunakan untuk menghitung IC_{50} . Konsentrasi diubah menjadi logaritma konsentrasi, dan persentase inhibisi pertama-tama dikonversi ke nilai probit untuk hasil perhitungan yang lebih tepat. Antilogaritma dari nilai probit 50 menghasilkan nilai IC_{50} . Perhitungannya mengacu pada persamaan regresi linier $y = ax + b$, sehingga nilai IC_{50} bisa ditentukan dengan memanfaatkan rumus:

$$\begin{aligned} y &= ax + b \\ 50 &= ax + b \\ IC_{50} &= \frac{50 - a}{b} \end{aligned}$$

3.5. Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini meliputi analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan melalui pengamatan uji makroskopik dan mikroskopik. Analisis kuantitatif diperoleh dari hasil pengukuran menggunakan instrumen laboratorium. Pada penetapan kadar flavonoid total, data dianalisis dengan regresi linier antara konsentrasi dan absorbansi berdasarkan kurva baku. Sedangkan pada uji aktivitas antioksidan metode DPPH, analisis dilakukan dengan regresi linier antara log konsentrasi dan probit untuk menentukan nilai IC_{50} menggunakan *software* komputer.