

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun tanaman ajeran (*Bidens pilosa* L.) yang terdapat di pinggir jalan dan belakang rumah.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun ajeran (*Bidens pilosa* L.) yang diambil dari bulan Januari 2025 di Kelurahan Lawu, Kecamatan Nguter, Kabupaten Sukoharjo, Provinsi Jawa Tengah dengan kondisi daun tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun ajeran (*Bidens pilosa* L.) yang dikeringkan menggunakan *food dehydrator* terhadap radikal bebas DPPH (*1,1 dyphenyl-2-pikrilhidrazil*).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi, diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun ajeran. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah radikal bebas DPPH, alat, kualitas bahan simplisia, dan serbuk daun ajeran. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah daya antioksidan dari ekstrak etanol daun ajeran.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun ajeran adalah daun dari tanaman ajeran (*Bidens pilosa* L.) yang diambil dari Kelurahan Lawu, Kecamatan Nguter, Kabupaten Sukoharjo, Provinsi Jawa Tengah.

Kedua, konsentrasi pelarut etanol adalah konsentrasi etanol yang akan digunakan sebagai pelarut dalam proses ekstraksi daun ajeran yang dinyatakan dalam persen yaitu 70% dan 96%.

Ketiga, *food dehydrator* merupakan sebuah mesin yang berfungsi untuk mengeringkan dengan cara menghilangkan kadar air yang terkandung di dalamnya.

Keempat, ekstrak etanol adalah ekstrak hasil ekstraksi serbuk daun ajeran dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%

dan 96% selama 24 jam dilakukan dua kali, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 55°C sampai diperoleh ekstrak kental daun ajeran

Kelima, aktivitas antioksidan adalah kemampuan dari ekstrak etanol daun ajeran dalam menangkap radikal bebas DPPH yang dinyatakan dengan nilai IC₅₀.

Keenam, DPPH adalah radikal bebas sintetik yang stabil dalam larutan metanol pro analisa dengan konsentrasi 0,4 mM.

C. Bahan dan Alat

Bahan utama dalam penelitian ini adalah daun ajeran (*Bidens pilosa* L.) yang diambil di pinggir jalan dan belakang rumah dari Kelurahan Lawu, Kecamatan Nguter, Kabupaten Sukoharjo, Provinsi Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, etanol 96%, metanol pro analisis, standar kuersetin, pereaksi DPPH (*1,1 dyphenyl-2-pikrilhidrazil*) dari sigma, FeCl₃, HCl pekat, magnesium, asam klorida 2 N, reagen Mayer, kloroform, asetat anhidrida, H₂SO₄ pekat, dan asam sulfat.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, botol maserasi, ayakan no. 60, *food dehydrator*, Spektrofotometer UV-Vis (Hitachi-U2900), timbangan analitik (Ohaus PA214), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph Laborata-4000), *moisture balance* (Ohaus-MB 23), vial, labu takar, gelas ukur, labu tentukur, dan alat gelas lainnya.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran tanaman daun ajeran (*Bidens pilosa* L.) yang berasal dari Kecamatan Lawu, Kabupaten Sukoharjo, Provinsi Jawa Tengah yang akan digunakan untuk penelitian ini. Tanaman yang akan diteliti dideterminasi terlebih dahulu di UPA Laboratorium.

2. Persiapan Bahan

Tanaman daun ajeran diambil dari Kelurahan Lawu, Kecamatan Nguter, Kabupaten Sukoharjo, Provinsi Jawa Tengah. Daun yang diambil adalah daun yang tidak terlalu muda maupun tidak terlalu tua, hijau, sehat, dan tidak berhama. Daun ajeran dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran atau debu yang menempel, kemudian ditiriskan, dan dimasukkan dalam mesin pengering *food dehydrator* pada suhu 50°C selama 5 jam.

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan kotoran dan mengurangi mikroba-mikroba yang menempel pada bahan. Pengeringan dilakukan supaya mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, dapat disimpan lebih lama, dan dapat mencegah penurunan mutu simplisia.

3. Pembuatan Serbuk

Daun ajeran yang sudah kering kemudian dibuat serbuk dengan cara digiling menggunakan blender. Setelah digiling halus serbuk diayak menggunakan pengayak ukuran Mesh 60. Hasil penyerbukan yang berupa serbuk kering dan disimpan dalam wadah kering serta tertutup.

4. Penetapan Susut Pengeringan Serbuk Daun Ajeran

Penetapan susut pengeringan serbuk daun ajeran menggunakan alat *moisture balance*. Dengan menimbang serbuk sebanyak 2 gram. Penetapan dilakukan dengan suhu 105°C kemudian ditunggu sampai hasilnya muncul angka dalam persen. Pengukuran susut pengeringan simplisia memenuhi syarat apabila mengandung kadar air kurang dari 10% (Depkes, 2008).

5. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Ajeran

Untuk pembuatan ekstrak dari serbuk kering simplisia dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Masukkan satu bagian serbuk kering simplisia daun ajeran yaitu 300 gram ke dalam wadah maserasi, kemudian tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Kemudian memisahkan maserat dengan cara filtrasi menggunakan kain flanel. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Maserat dikumpulkan menjadi satu, kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes, 2017).

Setelah itu menghitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan (Kemenkes, 2017).

6. Identifikasi Kandungan Kimia

6.1. Identifikasi Flavonoid. Pengujian adanya kandungan flavonoid dilakukan terhadap 1 mL ekstrak ditambah HCl pekat sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat. Setelah itu ditambahkan serbuk magnesium (Mg) lalu dilakukan pengocokan kuat. Sampel yang positif

mengandung flavonoid akan mengalami perubahan warna menjadi jingga (Huliselan *et al.*, 2015).

6.2. Identifikasi Tanin. Pengujian terhadap adanya kandungan tanin dilakukan terhadap 1 mL sampel ekstrak kemudian direaksikan dengan larutan feri klorida 5% (FeCl_3) sebanyak 3 tetes, kemudian amati terjadinya perubahan warna menjadi biru kehijauan, hijau-biru, atau adanya endapan (Mojab, 2003).

6.3. Identifikasi Saponin. Pengujian terhadap adanya kandungan saponin dilakukan terhadap 1 mL sampel ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, jika positif mengandung saponin akan terbentuk buih setinggi 1-10 cm tidak kurang 10 menit. Pada penambahan 1 tetes larutan asam klorida 2 N, apabila buih tidak hilang maka menunjukkan adanya saponin.

6.4. Identifikasi Alkaloid. Dalam penentuan senyawa alkaloid dimulai dengan penambahan larutan asam klorida 2 N sebanyak 5 mL ke dalam sampel ekstrak, kemudian dipanaskan diatas api bunsen. Setelah itu ditambahkan reagen mayer ke dalam campuran tadi. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan adanya endapan putih yang terbentuk.

6.5. Identifikasi Triterpenoid. Penentuan adanya senyawa triterpenoid dimulai dengan memasukkan 0,5 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL etanol 70% lalu diaduk, kemudian ditambahkan 1 mL kloroform dan 1 mL asetat anhidrida lalu didinginkan, setelah dingin ditambahkan H_2SO_4 pekat. Jika terbentuk warna kemerahan, maka menunjukkan adanya senyawa triterpenoid.

6.6. Identifikasi Steroid. Dalam penentuan senyawa steroid dilakukan dengan mereaksikan sampel uji dengan 2 mL kloroform. Kemudian ditambahkan 2 mL asam sulfat yang diteteskan lewat dinding tabung reaksi di dalam lemari asam. Jika terjadi pembentukan cincin warna merah coklat pada bagian bawah yang menandai keberadaan steroid.

7. Pembuatan Larutan DPPH

Dalam pembuatan larutan DPPH 0,4 mM dilakukan dengan menimbang sebanyak 15,8 mg, kemudian dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a sehingga didapat konsentrasi larutan DPPH 0,4 mM yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. Kemudian larutan ditempatkan dalam botol gelap dan digojog hingga homogen.

8. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum dilakukan dengan memasukkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM ke dalam vial gelap dan ditambahkan 4 mL metanol p.a yang kemudian dibungkus dengan aluminium foil lalu dihomogenkan. Selanjutnya dimasukkan dalam kuvet dan serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500-600 nm.

9. Penentuan *Operating Time* DPPH

Dalam penentuan *operating time* sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM ditambahkan dengan larutan standar kuersetin 2 ppm sebanyak 4 mL. Selanjutnya larutan serapannya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sampai mencapai absorbansi yang stabil.

10. Pengukuran Larutan Blanko DPPH 0,4 mM

Pengukuran dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan blanko DPPH 0,4 mM kemudian dimasukkan dalam vial gelap. Lalu ditambahkan metanol p.a ad 5 mL selanjutnya dibungkus dengan aluminium foil kemudian dihomogenkan. Proses inkubasi dilakukan di ruangan yang gelap terhindar dari cahaya selama *operating time* yang telah ditetapkan sebelumnya. Kemudian larutan blanko DPPH dimasukkan dalam kuvet lalu diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah didapatkan sebelumnya.

11. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Dalam pembuatan larutan pembanding kuersetin dilakukan dengan menimbang sebanyak 10 mg kuersetin lalu dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a (100 ppm). Selanjutnya dibuat beberapa variasi konsentrasi dari larutan induk yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm sebanyak 10 mL.

12. Pengukuran Daya Antioksidan Larutan Pembanding Kuersetin

Untuk tahapan pengujian pengukuran daya antioksidan larutan pembanding kuersetin dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 mL larutan kuersetin dari berbagai konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan dimasukkan dalam vial. Kemudian ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM ke dalam masing-masing vial dan ditambahkan metanol p.a sampai 5 mL. Kemudian digojog dan diinkubasi pada suhu ruang selama waktu yang diperoleh pada *operating time*. Dan diukur

absorbansinya pada panjang gelombang yang sudah diperoleh sebelumnya pada spektrofotometer UV-Vis.

13. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.)

Membuat larutan ekstrak dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan metanol p.a 10 mL (1000 ppm), selanjutnya dibuat seri konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm sebanyak 10 mL dari larutan induk.

14. Pengukuran Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.)

Pengujian dilakukan dengan cara memasukkan masing-masing konsentrasi larutan uji dari masing-masing larutan ekstrak sebanyak 1 mL ke dalam vial kemudian ditambahkan sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM, selanjutnya ditambahkan metanol p.a ad 5 mL lalu dikocok hingga tercampurkan seluruhnya kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama waktu yang diperoleh pada *operating time*. Serapan dari larutan tersebut kemudian diukur pada panjang gelombang yang telah didapatkan dari penentuan panjang gelombang maksimum yang sudah diperoleh sebelumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

E. Analisis Hasil

Aktivitas antioksidan dari sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase peredaman serapan DPPH dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan data yang dibutuhkan, selanjutnya dilakukan perhitungan aktivitas antioksidan radikal bebas DPPH (%) ekstrak etanol dan kuersetin dihitung dengan metode dari persamaan linier ($y = a+bx$) dan ditentukan nilai IC_{50} nya yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%.

Nilai IC_{50} lalu dianalisis secara statistik dengan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas. Jika data normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Independent Sample T test*.