

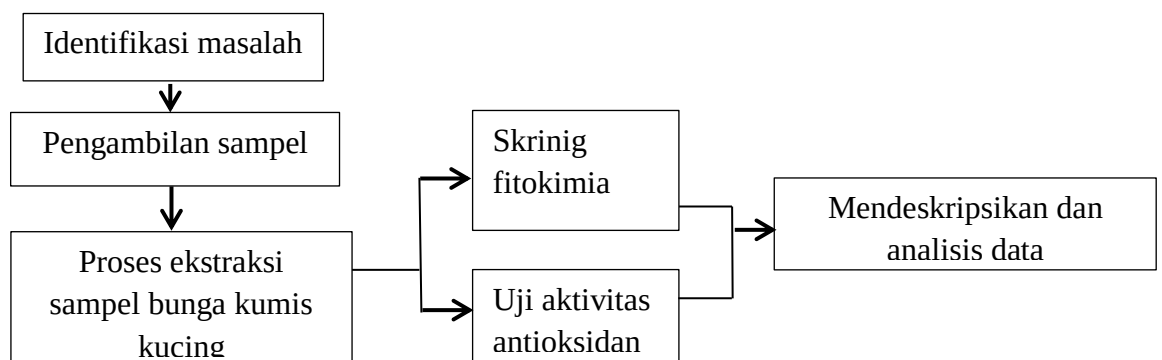
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis Penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif yaitu yang bertujuan untuk mengumpulkan data tentang keadaan suatu fenomena yang muncul selama penelitian ini berlangsung. Studi deskriptif tidak mengejar pengujian suatu hipotesis tertentu, tetapi hanya memberikan ilustrasi mengenai kondisi variabel, gejala, atau situasi yang ada. Penelitian deskriptif, yang memiliki dua fungsi utama dalam penyelidikan ilmiah menjawab pertanyaan penelitian non-hipotesis dan mengevaluasi hipotesis deskriptif. Menurut (Zellatifanny dan Mudjiyanto, 2018) metode deskriptif secara khusus memperkirakan karakteristik tertentu dari populasi yang diteliti tanpa menetapkan hubungan sebab akibat. Dalam penelitian ini data didapatkan dengan cara mendeskripsikan dan menggambarkan kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidan dengan sebagaimana adanya.

B. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel bunga kumis kucing dilakukan di Br. Kawan, Bangli. Pemeriksaan skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Kimia Terapan dan Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Waktu yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pada bulan Januari sampai bulan Mei 2025.

D. Sampel penelitian

Sampel dapat dipahami sebagai segmen dari populasi yang menjadi basis data utama dalam sebuah studi. Dengan kata lain, sampel merupakan sebagian dari populasi yang mewakili keseluruhan populasi. Metode pengambilan sampel sangat penting dalam penelitian karena digunakan untuk menentukan anggota mana dari populasi yang akan diikutsertakan sebagai sampel (Sulistiyowati, 2017). Bagian sampel yang digunakan untuk membuat ekstrak adalah hanya bunga dari tanaman kumis kucing berwarna putih dengan jumlah 2 kilogram bahan segar.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan pendekatan pengumpulan data primer dan sekunder. Seperti yang didefinisikan oleh (Pramiyati dkk, 2017) data primer merupakan informasi langsung yang diperoleh secara langsung dari

sumber asli melalui pekerjaan eksperimental atau pengukuran langsung. Sebaliknya, data sekunder merupakan informasi tambahan yang diperoleh dari sumber yang telah dikompilasi sebelumnya, bukan melalui observasi atau eksperimen langsung (Jabnabillah dkk., 2023). Kombinasi dari jenis data pelengkap ini memperkuat kerangka kerja penelitian dengan menyediakan hasil eksperimen asli dan referensi kontekstual dari literatur yang ada.

Dalam penelitian ini, data primer mencakup hasil dari skrining fitokimia serta hasil dari pengujian aktivitas antioksidan. Sementara itu, data sekunder dalam studi ini diperoleh dari literatur lain yang berkaitan dengan penelitian ekstrak bunga kumis kucing.

2. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan teknik analisis berbasis laboratorium untuk mengumpulkan data penelitian melalui dua pendekatan yang saling melengkapi yaitu skrining fitokimia kualitatif dan penilaian aktivitas antioksidan kuantitatif. Analisis kualitatif mengidentifikasi keberadaan senyawa bioaktif dalam ekstrak bunga kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) sedangkan evaluasi kuantitatif mengukur kapasitas penangkal radikal bebas menggunakan uji *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil* (DPPH) pada spektrofotometer.

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam proses mengumpulkan data dalam penelitian ini instrumen yang digunakan yaitu :

1) Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat tulis, kamera, pisau, neraca analitik (*Radwag*),blender (*getra*), rotary evaporator

(*buchi*), toples, tabung reaksi (*Iwaki*), labu takar (*Iwaki pyrex*), rak tabung, beaker glass, pipet tetes, pipet ukur, ball pipet, corong, batang pengaduk, spektrofotometer UV-vis.

2) Bahan

Bahan-bahan yang dipakai pada penelitian ini adalah bunga kumis kucing, etanol 70%, kertas saring (*Whatman*), tissue, aluminium foil, dragendrof, reagen mayer, NaOH, HCl, FeCl_3 , H_2SO_4 , gelatin 10%, akuades, gelatin.

3) Prosedur kerja

a. Pengambilan sampel

Sampel bunga kumis kucing diambil dari tanaman kumis kucing yang berada di pekarangan rumah tepatnya di Br. Kawan, Bangli. Bunga kumis kucing yang digunakan adalah yang berwarna putih tanpa tangkainya.

b. Pembuatan serbuk simplisia

Bunga kumis kucing yang diperoleh terlebih dahulu ditimbang dan disortir dengan cara basah. Selanjutnya, bunga tersebut dicuci menggunakan air yang mengalir, kemudian ditimbang untuk mendapatkan berat bunga kumis kucing yang masih segar. Setelah itu, bunga dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, dan dilakukan sortasi kering untuk memisahkan contoh dari bahan lain yang ikut campur. Kemudian, dilakukan penggilingan pada sampel kering, bisa menggunakan blender atau ditumbuk. Terakhir, timbang sampel yang telah kering.

c. Ekstraksi

Sampel bunga kumis kucing yang sudah dikeringkan dan digiling halus. Proses selanjutnya adalah ekstraksi yang dilaksanakan dengan metode maserasi memakai cairan pelarut alkohol 70%. Proses ekstraksi menggunakan rasio pelarut dan sampel 1:10 (w/v), di mana 250 gram simplisia bunga kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) digabungkan dengan 1 liter pelarut etanol 70%. Protokol standar melibatkan tiga tahap maserasi berurutan: awalnya, 250 gram bahan tanaman dicampur dengan 500 mL etanol 70% dan dimaserasi selama 24 jam, diikuti dengan penyaringan melalui corong tahan etanol untuk mendapatkan Maserat I. Ekstraksi kedua menggunakan 250 mL etanol 70% segar untuk periode 24 jam berikutnya untuk menghasilkan Maserat II, sedangkan siklus ketiga mengulangi proses ini dengan tambahan 250 mL pelarut untuk menghasilkan Maserat III.

Semua maserat yang terkumpul dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental. Metode ekstraksi multi-tahap ini, seperti yang dijelaskan oleh (Izazi dkk., 2024) memastikan pemulihan senyawa bioaktif secara menyeluruh dengan tetap mempertahankan efisiensi ekstraksi yang optimal. Suhu yang terkendali selama penguapan menjaga fitokimia yang termolabil sekaligus secara efektif menghilangkan pelarut etanol. Persentase hasil kemudian dihitung untuk mengevaluasi efektivitas ekstraksi.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat simplisia yang digunakan}} \times 100\%$$

Rendemen adalah rasio antara berat ekstrak yang dihasilkan dengan berat simplisia yang digunakan sebagai bahan baku. Nilai rendemen yang

tinggi menunjukkan bahwa jumlah ekstrak yang diperoleh cukup banyak, dan ini terjadi karena berat simplisia yang digunakan. Jika semakin berat simplisia yang digunakan, maka semakin banyak pula ekstrak dan rendemen yang akan diperoleh. Menghitung persentase rendemen bertujuan untuk mengetahui jumlah simplisia yang dibutuhkan dalam proses ekstraksi untuk mendapatkan jumlah ekstrak yang diharapkan (Egra dkk., 2019).

Penggunaan etanol 70% sebagai pelarut dipilih karena merupakan salah satu pelarut yang umum digunakan untuk mengekstraksi senyawa aktif dari tumbuhan. Selain itu, alasan lain pemilihan etanol 70% adalah karena senyawa flavonoid umumnya hadir dalam bentuk glikosida yang bersifat polar, sehingga membutuhkan pelarut dengan tingkat kepolaran yang sesuai. Etanol 70% termasuk dalam golongan pelarut polar dan memiliki tingkat polaritas yang lebih tinggi dibandingkan dengan etanol 96% (Novian, 2020).

d. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan diantaranya uji alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, dan tanin.

1. Alkaloid

Sampel alkaloid : Larutkan 100 mg sampel ekstrak pekat kedalam 5 ml HCL encer lalu saring

a. Uji *Dragendroff's*

Pipet 1 ml sampel uji alkaloid, tambahkan 1 ml reagen *Dragendroff's* dan dihomogenkan, hasil positif jika terbentuk endapan merah-coklat.

b. Uji *Mayer's*

Pipet 1 ml larutan sampel uji alkaloid, tambahkan 1-2 tetes Reagen Mayer's melalui dinding tabung reaksi. Hasil positif jika terbentuk endapan putih-kuning

2. Flavonoid

Sampel uji flavonoid: Larutkan 100 mg sampel ekstrak pekat ke dalam 5 ml akuades, lalu saring

a. Uji FeCl_3

Pipet 1 ml sampel ekstrak, tambahkan 3-5 tetes FeCl_3 10%. Hasil positif jika terbentuk endapan hijau.

b. Uji H_2SO_4 pekat

Pipet 1 ml sampel ekstrak, tambahkan 3-5 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif jika terbentuk warna jingga.

3. Saponin

Dipipet ekstrak bunga kumis kucing sebanyak 1 ml lalu tambahkan 2 ml aquades, kocok dengan kuat. Apabila terdapat busa yang tidak hilang selama 10 menit, hasil dikatakan positif.

4. Steroid

Analisis fitokimia dilakukan dengan memasukkan 2 g ekstrak sampel ke dalam tabung reaksi, diikuti dengan penambahan 2 mL etil asetat dan pengocokan dengan kuat. Lapisan etil asetat dipisahkan dengan hati-hati dan ditotolkan pada pelat bercak, kemudian dibiarkan mengering sepenuhnya. Setelah kering, sampel ditetesi dengan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Perkembangan warna berfungsi sebagai indikator diagnostik: pembentukan warna merah atau kuning mengkonfirmasi

keberadaan terpenoid, sedangkan perubahan warna hijau menunjukkan senyawa steroid.

5. Tanin

a. Uji emulsi NaOH

Pipet 0,5 ml sampel ekstrak, tambahkan 5 ml NaOH 10%, kocok hingga homogen. Hasil positif jika terbentuk emulsi

b. Uji gelatin

Larutkan 50mg sampel ekstrak pekat ke dalam 5ml akuades, kocok, tambahkan 1ml larutan gelatin 1% dan 1ml NaCl 10%. Hasil positif jika terbentuk endapan putih.

e. Uji senyawa antioksidan dengan metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode *2,2-difenil-1 pikrilhidrazil* (DPPH)

1. Pembuatan Larutan Induk Sampel

Pembuatan larutan induk 500 ppm dilakukan dengan melarutkan 50 mg ekstrak etanol bunga kumis kucing kedalam 100 mL akuades ke dalam labu ukur lalu divortex dan dihomogenkan. Kemudian pembuatan larutan variasi konsentrasi dengan seri konsentrasi yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Variasi konsentrasi dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Damanis dkk., 2020) :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan :

M_1 : Konsentrasi larutan awal

V_1 : Volume larutan awal

M_2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V_2 : Volume larutan setelah pengenceran

2. Pembuatan Larutan DPPH 40 ppm

Pembuatan larutan stock DDPH dengan cara menimbang sebanyak 4 mg serbuk DPPH dan dilarutkan dengan 100 ml methanol.

3. Pembuatan Serapan Larutan Blanko DPPH

Pembuatan blanko dilakukan dengan cara memipet sebanyak 2 ml larutan DPPH 40 ppm kemudian ditambahkan methanol sebanyak 2 ml kedalam botol vial dan inkubasi selama 30 menit. Lalu di masukan ke alat spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 516 nm.

4. Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Untuk pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara mencampurkan 2 mL larutan DPPH dengan 2 mL larutan sampel ekstrak etanol bunga kumis kucing ke dalam labu ukur 10 mL dengan seri larutan konsentrasi 40 ppm, 60 ppm, dan 100 ppm, setiap sampel dilakukan secara triplo. Kemuadian dihomogenkan dengan cara di vortex. Lakukan inkubasi pada ruang yang gelap dengan suhu 27^0 C selama 30 menit sampai terjadi perubahan warna. Lakukan pengukuran pada alat Spektrofotomter UV-Vis dengan panjang gelombang 516 nm.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Data skrining fitokimia akan diproses melalui analisis deskriptif untuk mengidentifikasi dan mendokumentasikan keberadaan metabolit

sekunder, termasuk alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, dan tanin, dalam ekstrak bunga kumis kucing Pendekatan kualitatif ini berfokus pada karakterisasi komposisi kimia ekstrak tanpa pengukuran kuantitatif. Untuk uji aktivitas antioksidan DPPH, analisis data kuantitatif akan dilakukan dengan menggunakan rumus perhitungan yang dijelaskan oleh (Septian dkk., 2022) :

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

Untuk mendapatkan nilai IC_{50} dapat dilakukan dengan melihat kurva garis yang melewati 50%. Daya hambat pada sumbu konsentrasi dapat menggunakan persamaan (Septian dkk., 2022) $y = a + bx$ yang dimana $y = 50$ dan x merupakan konsentrasi larutan uji yang dapat menghambat 50% larutan radikal bebas.

Perhitungan Nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*) yang digunakan untuk menghitung index aktivitas antioksidan dengan rumus (Mamay dkk., 2022) :

$$AAI = \frac{\text{Konsentrasi DPPH (ppm)}}{IC_{50} \text{ (ppm)}}$$

Table 2

Kriteria Nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*)

No.	Kriteria	Nilai AAI	Satuan
1.	Lemah	<0,5	Ppm
2.	Sedang	0,5-1,0	Ppm
3.	Kuat	1,0-2,0	Ppm
4.	Sangat kuat	>2,0	Ppm

(Ambari dkk., 2021)

2. Analisis data

Penelitian ini menggunakan analisis data yaitu pada hasil skrining fitokimia dianalisis melalui metode deskriptif kualitatif, dengan dokumentasi rinci tentang metabolit sekunder yang teridentifikasi (flavonoid, alkaloid, steroid, tanin, dan saponin.) yang ada dalam ekstrak bunga kumis kucing. Untuk uji aktivitas antioksidan, analisis deskriptif kuantitatif dilakukan, dengan hasil yang disajikan dalam format tabel dan ditafsirkan berdasarkan dua parameter utama nilai IC_{50} dan nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI).

G. Etika Penelitian

Etika penelitian berhubungan dengan prinsip, norma, dan nilai yang menetapkan pedoman untuk pemahaman ilmiah dalam sebuah komunitas. Poin ini sangat krusial untuk mencegah adanya penyimpangan dalam proses penelitian, termasuk perlakuan yang tidak setara terhadap partisipan, kesalahan dalam hasil, manipulasi data, serta tindakan plagiarisme. Selain itu, etika penelitian juga berfungsi sebagai alat untuk menilai kualitas riset mulai dari tahap perencanaan, pengumpulan informasi, analisis, hingga pelaporan serta publikasi hasil kajian. Inti dari etika penelitian adalah penerapan prinsip-prinsip moral dalam setiap tahapan penelitian (Debnath & Chatterjee, 2021) .

Menurut (Putra dkk., 2023) komponen etika yang penting bagi peneliti meliputi: menjaga kejujuran dalam pelaporan data, menjaga objektivitas dalam analisis, menunjukkan integritas dalam metodologi, melakukan ketekunan dalam pelaksanaan, memastikan keakuratan dalam hasil, menerapkan proses verifikasi, menunjukkan rasa hormat terhadap kekayaan intelektual, mengakui tanggung jawab sosial, menjaga kompetensi

profesional, dan secara ketat mengikuti peraturan yang berlaku. Prinsip-prinsip dasar ini berfungsi sebagai landasan untuk penyelidikan ilmiah yang kredibel dan membantu menjaga kepercayaan publik terhadap temuan penelitian. Kerangka kerja etika mengharuskan para peneliti untuk menyeimbangkan ketelitian ilmiah dengan pertimbangan moral, terutama ketika bekerja dengan bahan biologis atau subjek manusia. Dengan menginternalisasi nilai-nilai ini, para peneliti berkontribusi pada kemajuan pengetahuan sambil menjunjung tinggi standar integritas akademik tertinggi. Penerapan elemen-elemen etika ini pada akhirnya meningkatkan kemampuan reproduksi penelitian dan memperkuat validitas kesimpulan ilmiah.

1. Kejujuran

Kejujuran adalah sikap terbuka dalam mengumpulkan referensi, mengumpulkan informasi, melaksanakan metode serta prosedur penelitian, menerbitkan hasil, dan lain-lain, serta jujur terhadap kelemahan atau kegagalan dari metode yang diterapkan.

2. Objektivitas

Objektivitas ialah tindakan untuk meminimalisasi Kesalahan atau kecenderungan dalam melakukan analisis penelitian, penelitian perlu memiliki sifat objektif baik dalam ciri-ciri maupun langkah-langkahnya.

3. Integritas

Integritas merupakan sebuah usaha untuk senantiasa mempertahankan keselarasan antara pemikiran dan tindakan sepanjang proses penelitian.

4. Ketepatan

Ketepatan, Keakuratan, bahwa sebuah studi juga wajib memiliki level keakuratan dan ketepatan, secara teknis alat untuk mengumpulkan data harus memiliki validitas dan keandalan yang cukup, desain studi, pemilihan sampel, dan metode analisis data harus sesuai.

5. Tanggung jawab sosial

Bertanggung jawab secara sosial , yang berarti berusaha untuk penelitian ini agar dapat bermanfaat bagi kesejahteraan masyarakat, memperbaiki kualitas hidup, mempermudah kehidupan, serta mengurangi beban masyarakat. Peneliti juga memiliki kewajiban untuk mendampingi masyarakat yang akan menerapkan hasil penelitiannya.

6. Kompetensi

Kemampuan, bahwa riset seharusnya dilakukan oleh individu yang memiliki pemahaman dan keahlian yang relevan dengan disiplin ilmunya.

7. Legalitas

Legalitas merujuk pada kesadaran dan kepatuhan terhadap regulasi institusi serta kebijakan pemerintah yang berkaitan dengan pelaksanaan suatu penelitian