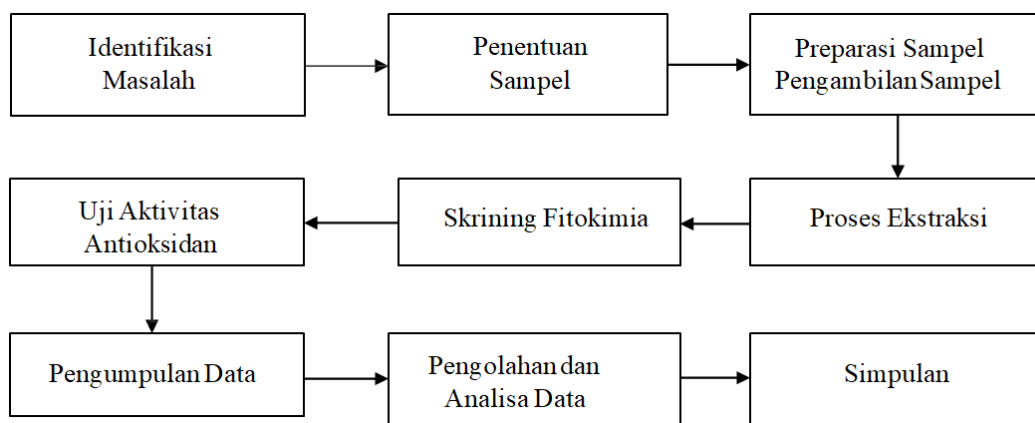


BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam studi ini bersifat deskriptif, dengan tujuan menentukan nilai satu atau lebih variabel tanpa membandingkan atau mengaitkannya dengan variabel lain. Data yang dikumpulkan kemudian dianalisis secara deskriptif untuk menjelaskan kandungan senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan pada sampel yang diteliti.



Gambar 3 Bagan Alur Penelitian

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Terapan dan Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Kesehatan Denpasar yang bertempat di Jl.Sanitasi No.1 Sidakarya, Denpasar

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2024 sampai bulan Mei 2025.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari *Hortensia Garden* yang berlokasi di Desa Panji Anom, Kecamatan Sukasada, Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali. Pemilihan lokasi tersebut didasarkan pada pertimbangan kondisi ekologi yang paling sesuai untuk pertumbuhan optimal tanaman *Hydrangea*. Selain itu, *Hortensia Garden* dikenal sebagai pemasok bunga hortensia dengan kualitas yang konsisten. Pengelolaan tanaman yang dilakukan secara teratur di kebun tersebut memungkinkan proses pengambilan sampel yang seragam, sehingga mendukung diperolehnya hasil penelitian yang lebih akurat dan dapat diandalkan.



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 4. Sampel batang hortensia (*Hydrangea macrophylla*)

2. Kriteria Sampel

Kriteria sampel tanaman *Hydrangea macrophylla* yang digunakan adalah batang yang segar, tidak membusuk, berwarna cokelat, dan bebas dari tanda-tanda serangan hama.

D. Jenis Dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer, yaitu kadar senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol batang *Hydrangea macrophylla*.

2. Cara pengumpulan data

Dalam penelitian ini, pengumpulan data dilakukan melalui pengujian laboratorium. Analisis kualitatif dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa fitokimia, sementara aktivitas antioksidan ekstrak etanol batang *Hydrangea macrophylla* diukur secara kuantitatif menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dengan bantuan spektrofotometer.

3. Alat dan bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik (Radwag), gelas ukur (Iwaki Pyrex), pipet tetes, pipet ukur, labu ukur, corong, batang pengaduk, tabung reaksi, gelas kimia (beaker), spektrofotometer UV-Vis, blender, pipet tetes (dropper), rotary evaporator (Büchi), rak tabung reaksi, serta alat skala bangku (bench scale).

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi batang *Hydrangea macrophylla*, reagen Dragendorff (Merck), asam sulfat pekat, reagen Mayer-Wagner (Merck), asam sulfat (H_2SO_4) pekat, serbuk magnesium (Mg), asam klorida pekat (HCl), asam asetat anhidrat, larutan HCl 2N, bubuk DPPH (E Merck), larutan FeCl_3 1%, kertas saring, etanol 70%, tisu, serta aluminium foil.

4. Prosedur penelitian

a. Pengambilan sampel

Sampel batang *Hydrangea macrophylla* diperoleh dari Desa Panji Anom, Kecamatan Sukasada, Kabupaten Buleleng. Penelitian ini menggunakan 2 kg bunga segar sebagai bahan sampel.

b. Pembuatan serbuk simplisia

- (1) Batang *Hydrangea macrophylla* yang diterima merupakan batang segar dengan berat maksimum mencapai 2 kg.
- (2) Selanjutnya, batang dicuci menggunakan air mengalir, kemudian bagian yang basah dipisahkan.
- (3) Setelah itu, batang *Hydrangea macrophylla* dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 3 hari.
- (4) Setelah kering, batang *Hydrangea macrophylla* dipilah kembali untuk memisahkan sampel batang dari benda asing yang mungkin tercampur selama proses pengeringan.
- (5) Terakhir, batang *Hydrangea macrophylla* dihaluskan menggunakan blender atau mortar, kemudian berat keringnya diukur.

c. Ekstraksi

- (1) Batang hortensia dikeringkan dan dihaluskan.
- (2) Selanjutnya, ekstraksi dilakukan menggunakan metode maceration dengan perbandingan serbuk batang *Hydrangea macrophylla* dan pelarut 1:5. Sebanyak 200 g serbuk batang dicelupkan ke dalam 2.000 ml etanol 96%, lalu ditutup dan dibiarkan selama 2 hari. Proses ini dilakukan agar pelarut etanol dapat mengikat metabolit sekunder dengan efektif.

- (3) Setelah 2 hari, larutan filtrat disaring, kemudian sisa batang *Hydrangea macrophylla* ditambahkan kembali dengan 2000 ml etanol 96%. Campuran tersebut ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 2 hari
- (4) Setelah periode kedua selama 2 hari, campuran disaring lagi, dan proses yang sama diulang sebelum disimpan selama 3 hari.
- (5) Setelah disimpan selama tiga hari, hasil macerasi disaring untuk memisahkan larutan ekstrak. Selanjutnya, ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak pekat. Konsentrasi ekstrak tersebut kemudian dihitung menggunakan persamaan berikut.

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

ekstrak tersebut digunakan untuk pemeriksaan fitokimia serta pengujian aktivitas antioksidan (Fitriyanti, Qalbiyah, Sayakti., 2020)

d. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia mencakup uji fenol, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid (Kirana, 2019)

(1) Uji Alkaloid

- Ambil sampel sebanyak 0,5 mL
- Kemudian ditambah 0,5 mL HCl 1% .
- Tambahkan 1-2 tetes reagen *Dragendorff*.
- Terbentuknya endapan warna putih kekuningan pada sampel menunjukkan positif pada uji alkaloid.

(2) Uji Flavonoid

- Ambil sampel sebanyak 5 tetes
- Tambahkan 5 tetes NaOH 2%
- Kemudian tambahkan beberapa tetes HCl, positif jika berubah menjadi warna kuning.

(3) Uji Saponin

- Ambil 5 tetes sampel
- Kemudian tambahkan 10 tetes air panas
- Selanjutnya kocok kuat-kuat akan membentuk busa selama 5 menit
- Kemudian ditambahkan 1 tetes HCl 2 N positif jika busa tidak hilang.

(4) Uji Steroid/ Terpenoid

- Ambil 5 tetes sampel
- Tambahkan 5 tetes kloroform
- Kemudian tambahkan 10 tetes anhidra asetat
- Tambahkan 3 tetes asam sulfat pekat, positif jika berubah menjadi biru atau hijau.

(5) Uji Tanin

- Ambil 5 tetes sampel
- Kemudian tambahkan FeCl₃ 5%.
- Positif jika berubah menjadi warna hijau atau biru.

e. Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, dilakukan sebagai berikut (Damanis dkk., 2020) dengan modifikasi :

(1) Pembuatan Larutan DPPH (40 ppm)

Larutan DPPH dengan konsentrasi 40 ppm dibuat dengan melarutkan 4 mg DPPH ke dalam 100 mL etanol 96% di dalam labu segitiga. Untuk meminimalkan degradasi senyawa, larutan tersebut disimpan di tempat gelap selama 30 menit.

(2) Pembuatan larutan induk

Ekstrak yang telah dikonsentrasikan ditimbang hingga **maksimal 100 mg**, kemudian dilarutkan dalam **100 mL etanol** untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi **1.000 ppm**.

(3) Pembuatan seri konsentrasi ekstrak

Serangkaian konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Perhitungan konsentrasi sampel mengikuti rumus : $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$. Untuk pengaturan konsentrasi 25 ppm, digunakan labu ukur berkapasitas 10 mL.

$$\begin{aligned} 10 \times 25 &= V_2 \times 1000 \\ 250 &= V_2 \times 1000 \\ V_2 &= 0,25 \end{aligned}$$

Dari larutan sampel yang dilarutkan pada konsentrasi 1000 ppm, sebanyak 0,25 ml diambil menggunakan pipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang menunjukkan konsentrasi 25 ppm. Selanjutnya, etanol ditambahkan hingga mencapai batas volume yang telah ditentukan. Prosedur ini diulang menggunakan perhitungan yang sama hingga konsentrasi sampel mencapai 100 ppm.

(4) Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml ekstrak etanol bunga *Hydrangea macrophylla*

dengan berbagai konsentrasi. Campuran tersebut dikocok selama 1 menit hingga homogen, lalu dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap. Selanjutnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang 516 nm. Persentase penghambatan radikal DPPH (IC_{50}) untuk setiap konsentrasi sampel dihitung menggunakan rumus berikut.

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

Aktivitas antioksidan umumnya dinyatakan dalam bentuk konsentrasi hambat 50% (**IC₅₀**), yaitu konsentrasi sampel yang mampu menekan 50% radikal DPPH. Nilai IC₅₀ ditentukan dengan memasukkan nilai y sebesar 50 ke dalam persamaan linier yang menghubungkan konsentrasi (x) dengan persentase hambatan (y). Setelah menghitung persentase inhibisi untuk setiap konsentrasi, dilakukan perhitungan regresi linear menggunakan persamaan yang sesuai. Selanjutnya, untuk menentukan Indeks Aktivitas Antioksidan (Antioxidant Activity Index, AAI), digunakan rumus khusus yang telah ditetapkan.

$$\text{Nilai AAI} = \frac{\text{Konsentrasi DPPH}}{\text{Nilai IC}_{50}}$$

E. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Pengolahan data dilakukan dengan pendekatan deskriptif untuk menjelaskan kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak etanol bunga *Hydrangea macrophylla*, yang mencakup senyawa seperti alkaloid, saponin, flavonoid, steroid, dan tanin. Sementara itu, pengolahan data untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan bunga *Hydrangea macrophylla* menggunakan metode DPPH dilakukan berdasarkan perhitungan yang mengacu pada rumus tertentu.

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

2. Analisis Data

Untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder pada ekstrak etanol

batang *Hydrangea macrophylla*, dilakukan analisis terhadap data skrining fitokimia. Aktivitas antioksidan dievaluasi secara kuantitatif dan hasilnya disajikan dalam bentuk tabel, dengan interpretasi hasil berdasarkan tingkat kekuatan yang ditentukan oleh nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI).