

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimen. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi, Laboratorium Kimia dan Laboratorium Fitokimia Prodi D-III Farmasi, Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan April sampai bulan Juni 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) yang berada di Kupang, Nusa Tenggara Timur.

2. Sampel dan teknik sampling.

a. Sampel

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) yang diambil sebanyak 2 kg dari Kelurahan Kayu Putih, Kecamatan Oebobo, Nusa Tenggara Timur.

b. Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah *purposive sampling*, dengan kriteria daun berwarna hijau ketuaan dan segar.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) dengan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm.

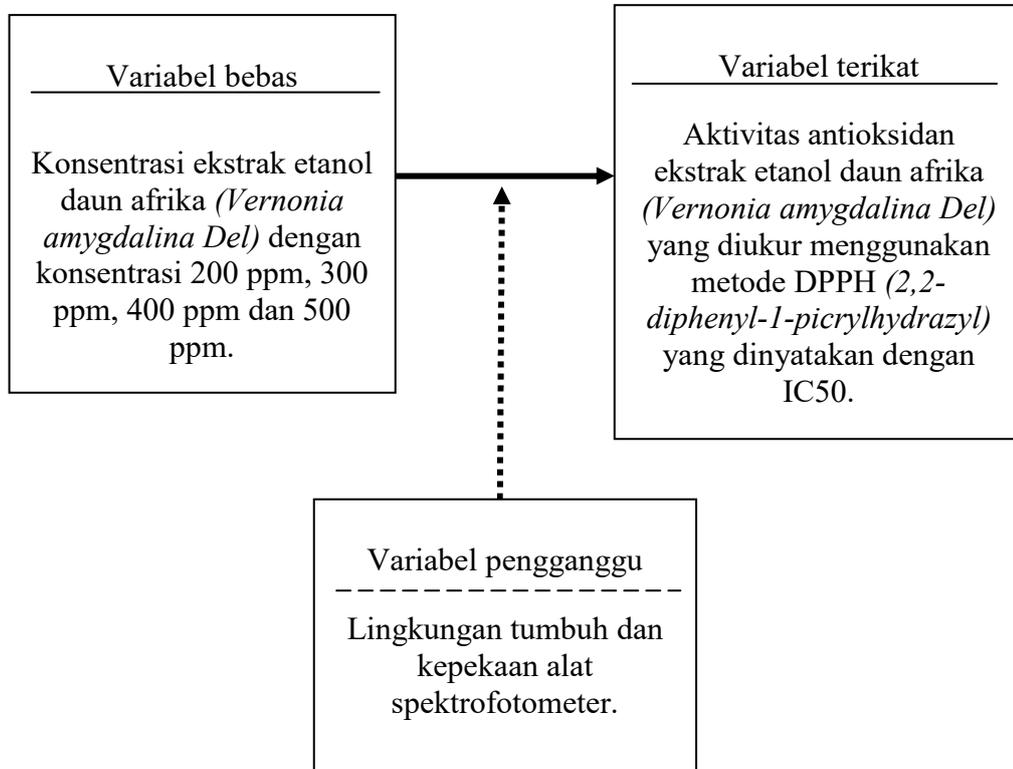
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) yang diukur menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) yang dinyatakan dengan IC50.

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu dari penelitian adalah lingkungan tumbuh dan kepekaan alat spektrofotometer.

E. Kerangka Konsep



Keterangan :
————— : Yang diteliti
..... : Tidak diteliti

Gambar 2. Hubungan antar variabel

F. Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Skala
1.	Aktivitas antioksidan	Kemampuan ekstrak etanol daun afrika (<i>Vernonia amygdalina Del</i>) untuk menghambat radikal bebas DPPH, diukur menggunakan metode DPPH	Spektrofotometer	Rasio
2.	Ekstrak etanol daun afrika (<i>Vernonia amygdalina Del</i>)	Ekstrak yang diperoleh dari daun afrika (<i>Vernonia amygdalina Del</i>) menggunakan pelarut etanol.		Rasio
3.	Metode DPPH	Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan, yang melibatkan reaksi antara ekstrak dengan radikal bebas DPPH.	Spektrofotometer	Rasio
4.	Konsentrasi ekstrak	Jumlah ekstrak yang digunakan dalam penelitian, dinyatakan dalam satuan mg/mL.		Rasio
5.	Nilai IC50	Parameter konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% aktivitas antioksidan		Rasio

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-2600), neraca digital, neraca analitik, bejana maserasi, Herbs grinder MKS-ML200, batang pengaduk (pyrex), cawan porselin, pipet tetes, corong, *waterbath*, *Rotary Evaporator*, *aluminum foil*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penjepit tabung, kaca arloji, sendok tanduk, kertas perkamen, labu ukur 25 mL (IWAKI), labu ukur 50 mL (IWAKI), labu ukur 100 mL (IWAKI), vial, mikro pipet, *beaker glass* 250ml (pyrex), dan kain saring putih.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*), aquadest, etanol 70%, etanol 95%, DPPH, vitamin c, Hcl pekat, serbuk magnesium, Perekasi Mayer, Fecl₃ 1%.

H. Prosedur Penelitian

1. Sampel

a. Pembuatan serbuk simplisia daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*)

Daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) yang telah disortir dicuci dengan air mengalir. Lalu ditiriskan kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai sampel kering. Kemudian ditimbang dalam keadaan kering dan giling sampai terbentuk bubuk halus. Lalu di ayak dan simplisia siap diekstraksi (Ningsih *et al.*,2013). Proses persiapan sampel di mulai dari pengumpulan daun afrika (*Vernonia*

amygdalina Del.) dari Kelurahan Kayu Putih, Kecamatan Oebobo, Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT). Kemudian di lakukan sortasi basah, lalu di cuci di bawah air mengalir, setelah itu, di lanjutkan dengan proses pengeringan di bawah sinar matahari sampai daunnya menjadi setengah kering, kemudian dioven sampai benar-benar kering. Lalu, sampel yang telah kering di haluskan menggunakan grinder dan menghasilkan serbuk simplisia yang berpartikel kecil agar pada proses maserasi (penyarian zat aktif) pelarutnya dapat menembus dinding sel dari simplisia tersebut. Serbuk simplisia selanjutnya di timbang dan di lakukan maserasi selama 5 hari (3 hari maserasi dan 2 hari remaserasi).

- b. Ekstraksi daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) dengan metode maserasi

Serbuk simplisia daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) direndam dalam pelarut etanol, rendam dalam keadaan tertutup rapat dan diamkan pada suhu ruang selama 5 hari, terlindung dari sinar matahari langsung. Aduk sesekali. setelah filtratnya disaring selama 5 hari. Filtratnya disimpan dalam toples atau wadah yang digunakan untuk proses maserasi, ampas disimpan di wadah lain. Total filtrat campuran yang dihasilkan dipekatkan dalam oven pada suhu 55°C sampai diperoleh ekstrak yang kental (Ulfah, 2023).

2. Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder

a. Uji alkaloid

Sampel 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambah 1 mL HCl 2 N dan 9 mL aquadest, kemudian dipanaskan di atas waterbath dalam waktu 2-3 menit. Dinginkan larutan sampel kemudian saring filtrate. Hasil filtrate ditampung pada empat tabung reaksi berbeda. Filtrat ditambahkan larutan Mayer, larutan Bouchardat, larutan Dragendrof dan blanko. Positif alkaloid setelah penambahan larutan Mayer, Bouchardat, dan Dragendrof secara berturut-turut adalah terbentuk endapan putih, jingga, coklat sampai hitam (Julianto, 2019).

b. Uji flavonoid

Ekstrak kental dari berbagai ekstrak di ambil sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 10 mL metanol kemudian dibagi ke dalam 4 tabung reaksi. Tabung pertama digunakan digunakan sebagai tabung kontrol, tabung ke dua, ke tiga dan ke empat berturut-turut di tambahkan NaOH, H₂SO₄ Pekat ,dan serbuk Mg-HCl Pekat. Warna pada masing-masing tabung dibandingkan dengan tabung kontrol, jika terjadi perubahan warna dari tabung kontrol maka positif mengandung flavonoid. Terbentuknya warna merah,kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid (Julianto, 2019).

c. Uji tanin

Ekstrak sebanyak 1 gram ditambahkan 10 mL aquades kemudian dididihkan. Setelah dingin filtrat ditambahkan 5 mL FeCl₃ 1 % (b/v). Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru tua, hijau dan hijau-hitam, berarti sampel mengandung tanin (Rahmasiahi *et al.*, 2023).

d. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*)

1) Penyiapan larutan uji ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*)

Ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) ditimbang sebanyak 500 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% didalam labu ukur 50 ml sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 10000 ppm. Larutan ekstrak etanol daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) dari larutan induk tersebut dibuat dengan seri konsentrasi pengenceran yaitu 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm,

2) Penyiapan larutan DPPH

Ditimbang serbuk DPPH sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% sampai tanda batas pada labu ukur 50 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM, yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. Labu takar yang digunakan

dilapisi aluminium foil dan disimpan terhindar dari cahaya matahari.

3) Penyiapan larutan pembanding

Larutan vitamin c dibuat dengan cara menimbang 10 mg serbuk vitamin c, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambah etanol 95% hingga tanda batas. Larutan ini disebut larutan induk dengan konsentrasi 200 ppm yang kemudian diencerkan menjadi konsentrasi yang lebih kecil yaitu 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm dan 4 ppm.

4) Penentuan panjang gelombang

Sebanyak 4 mL blanko yaitu etanol 95% dimasukkan kedalam vial, ditambahkan 1 mL larutan DPPH, lalu ditutup dan diukur pada Panjang gelombang 515-520 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

5) Absorbansi peredaman radikal DPPH

Blanko, larutan uji dan larutan pembanding yang dibuat dalam beberapa konsentrasi diambil sebanyak 4 mL ditambahkan 1 mL larutan DPPH dimasukkan dalam vial lalu dikocok. Larutan didiamkan selama 30 menit, kemudian dibaca serapannya pada Panjang gelombang maksimum. Blanko yang digunakan adalah alkohol 95%.

I. Analisis Data

Melakukan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol dengan metode DPPH yang dinyatakan dalam nilai IC50. Data yang diperoleh dianalisis dengan *spektrofotometri UV-Vis* yang digunakan untuk menghitung presentase perendaman radikal bebas DPPH dari konsentrasi 200, 300, 400, 500 ppm. Persentase (%) perendaman radikal bebas DPPH dihitung menggunakan rumus :

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

Keterangan : Abs blanko :serapan radikal DPPH 1 Mm

Abs sampel :serapan sampel terhadap radikal bebas DPPH 0,4 mM

Daya antioksidan peredaman radikal bebas DPPH (% perendaman) ekstrak etanol daun afrika (*Vernonia amygdalina Del*) serta pembanding vitamin c, dianalisis dan masing-masing dihitung nilai IC50 menggunakan analisis regresi linear.

$$y = a + bx$$

keterangan:

y : presentase aktivitas antioksidan

x : konsentrasi larutan uji

a : tetapan slope

b : tetapan intersep

Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak sebagai absis (sumbu x) dan nilai presentase

perendaman (aktivitas antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y). Hasil analisis regresi linear berupa nilai x, dan dimasukkan ke dalam rumus $IC_{50} = \text{anti Ln}(x)$ dan ditentukan tingkat kekuatan antioksidannya.