

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimen. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan gambaran aktivitas antioksidan fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun jarak merah dan gambaran metabolit sekundernya.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini akan dilakukan Laboratorium Kimia, Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi, dan Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Mei tahun 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman jarak merah yang berasal dari Naimata, Kupang, NTT.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil fraksinasi *n*-heksan dari ekstrak etanol 95% daun jarak merah.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi *n*-heksan ekstrak etanol 95% daun jarak merah yaitu 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm.

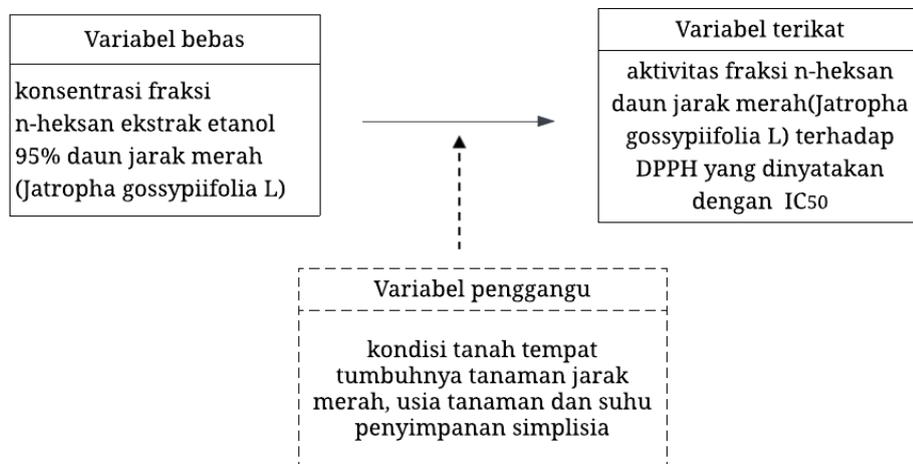
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas fraksi *n*-heksan daun jarak merah terhadap DPPH yang dinyatakan dengan IC₅₀.

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu adalah kondisi tanah tempat tumbuhnya tanaman jarak merah, usia tanaman dan suhu penyimpanan simplisia.

E. Kerangka Konsep



Gambar 2. Hubungan antar variabel

Keterangan :

= Variabel yang diteliti

= Variabel yang tidak diteliti

F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Skala
1	Aktivitas antioksidan	Kemampuan ekstrak etanol daun bunga putih dalam meredam radikal DPPH berdasarkan nilai IC_{50} dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis	Rasio
2	Fraksi <i>n</i> -heksan	Fraksi kental hasil maserasi serbuk daun jarak merah dengan pelarut <i>n</i> -heksan dibagi menjadi lima seri konsentrasi yaitu 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm	Rasio
3	Ekstrak etanol	Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi daun jarak merah menggunakan pelarut etanol 95%	Nominal
4	Daun jarak merah	Daun jarak merah yang diambil dari Naimata, Kupang NTT	Nominal
5	Metode DPPH	Metode yang digunakan untuk meredam radikal bebas untuk mengetahui aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer UV-Vis	Rasio
6	Nilai IC_{50}	Parameter konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% aktivitas antioksidan.	Rasio

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah Bejana maserasi (wadah kaca), cawan porselen, batang pengaduk, tabung reaksi (*pyrex*), corong pisah (*iwaki*), labu ukur (*pyrex*), tabung reaksi (*iwaki*), sendok tanduk, corong kaca (*pyrex*), timbangan analitik (Type Ew-220-3NM), *Rotary Evaporator* (Eyela type N-1000), *waterbath* (memmert), blender (Cosmos), ayakan No 60 dan Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu Type UV-1700).

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun jarak merah, serbuk DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), etanol 95%, tisu, aluminium foil, kertas perkamen dan kertas saring.

H. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan bahan

Daun jarak merah diambil di kelurahan Naimata, dengan kriteria yang masih segar dan berwarna merah hingga hijau kemerahan.

2. Pembuatan serbuk simplisia

Daun jarak merah yang diambil dilakukan sortasi basah untuk memisahkan daun dari kotoran, ranting dan daun yang rusak. Hasil sortasi ditimbang sebanyak 1 kg dan dicuci bersih pada air mengalir dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah itu diserbukkan dan diayak menggunakan ayakan nomor 60 *mesh*, dan ditimbang sesuai kebutuhan.

3. Maserasi serbuk simplisia daun jarak merah

Serbuk simplisia daun jarak merah sebanyak 250 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam wadah maserasi, ditambahkan 1.875 mL pelarut etanol 95%, diaduk hingga merata, kemudian ditutup rapat. Rendam selama 5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari, saring sarinya, tambahkan 625 mL etanol 95% ke dalam residu, biarkan selama 2 hari lagi, lalu saring. Maserasi pertama dan kedua dicampur dalam penangas air bersuhu 60 °C hingga diperoleh ekstrak kental (Willian dan Pardi, 2016).

Kemudian hitung % rendemen menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot serbuk simplisia}} \times 100\%$$

4. Pembuatan fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun jarak merah

Sebanyak 10 g ekstrak etanol 95% daun jarak merah pertama kali dilarutkan dengan air panas dan difraksinasi dengan 250 mL *n*-heksan menggunakan corong pisah dan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali dan dikumpulkan kelima pengulangan fraksi pada wadah yang sama. Kemudian hasil fraksinasi dipekatkan hingga mendapat fraksi kental.

I. Uji Fitokimia

1. Identifikasi alkaloid

Sebanyak 0,5 g fraksi *n*-heksan ditambahkan 2 mL etanol 70% kemudian diaduk. Campuran disaring kemudian ditambahkan sedikit air panas, selanjutnya di tambahkan pereaksi Mayer, Dragendorf dan Wagner ditetesi dengan 3-5 tetes pereaksi diatas. Jika mengandung alkaloid, akan terlihat endapan dan perubahan warna sebagai hasil reaksi (Tjitda dan Nitbani, 2019).

2. Identifikasi flavonoid

Sebanyak 0,1 g fraksi *n*-heksan dilarutkan dalam 10 mL etanol 70%, dibagi kedalam tiga tabung, tabung pertama digunakan sebagai kontrol positif, tabung kedua berisi sampel ditambah NaOH, tabung ketiga berisi sampel ditambah H₂SO₄. Jika terdapat perubahan warna pada tabung dua dan tiga maka sampel positif mengandung flavonoid (Tjitda dan Nitbani, 2019).

3. Identifikasi tanin

Fraksi *n*-heksan sebanyak 0,1 g di larutkan ke dalam metanol, selanjutnya

ditetesi 2-3 larutan FeCl₃ 1%. Jika mengandung tanin, akan terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman sebagai hasil reaksi (Tjitda dan Nitbani, 2019).

4. Identifikasi saponin

Fraksi *n*-heksan sebanyak 0,1 g ditambahkan 15 mL aquades yang telah dipanaskan lalu dikocok selama 10 detik dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl 2 N. Uji saponin dianggap positif jika terbentuk buih yang stabil bertahan selama minimal 10 menit (Tjitda dan Nitbani, 2019).

J. Uji Aktivitas Antioksidan

1. Penyiapan larutan uji

Ditimbang 50 mg fraksi *n*-heksan daun jarak merah dilarutkan dengan etanol 95% dalam labu takar hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Ekstrak awal diencerkan berturut-turut dengan etanol hingga 1000 ppm sehingga konsentrasinya diperoleh 25, 50, 75, 100 dan 125 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 200 ppm.

3. Penyiapan larutan pembanding

Larutan pembanding vitamin C dibuat dengan menimbang 10 mg vitamin C, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml. Kemudian, ditambahkan 5 ml etanol 95% dan dikocok hingga tercampur rata. Larutan tersebut kemudian dicukupkan dengan etanol 95% hingga mencapai tanda batas, menghasilkan konsentrasi larutan vitamin C 200 ppm. Selanjutnya, dibuat

larutan uji pembanding dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 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 etanol 95%.

K. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan Spektrofotometri UV-Vis yang digunakan untuk menghitung presentase perendaman radikal bebas DPPH. 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 0,5 mM.

Abs sampel : serapan sampel terhadap radikal bebas DPPH 0,5 mM.

Daya antioksidan peredaman radikal bebas DPPH (% peredaman) fraksi *n*-heksan daun jarak merah serta pembanding vitamin C, dianalisis

dan masing-masing dihitung nilai IC_{50} 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 peredaman (aktivitas antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y). hasil analisis regresi linear berupa nilai x, dan dimasukkan ke dalam rumus $IC_{50} = \text{anti Log}(x)$ dan ditentukan tingkat kekuatan antioksidannya.