

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan gambaran aktivitas antioksidan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) dan gambaran metabolit sekundernya.

B. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia serta Laboratorium Instrumentasi Program Studi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Kegiatan penelitian berlangsung dari April hingga Mei 2025.

C. Populasi dan sampel

1. Populasi

Penelitian ini menggunakan populasi berupa tanaman daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) yang berasal dari Naimata, Kecamatan Maulafa, Kota Kupang.

2. Sampel

Jenis sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil fraksi kloroform ekstrak etanol 95% daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi dari fraksi kloroform ekstrak etanol 95% daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) sebagai variabel bebas.

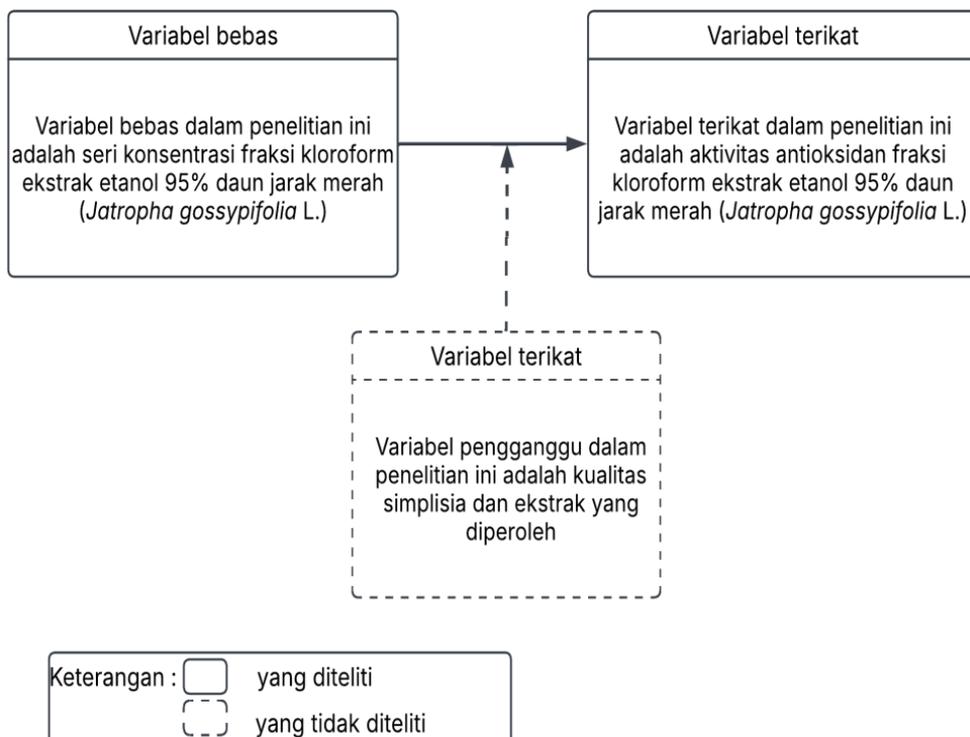
2. Variabel terikat

Aktivitas antioksidan dari fraksi kloroform ekstrak etanol 95% daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) merupakan variabel terikat dalam penelitian ini.

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu dalam penelitian ini berupa mutu simplisia serta ekstrak hasil ekstraksi.

E. Kerangka Konsep



F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala
1	Aktivitas antioksidan	Kemampuan fraksi kloroform ekstrak etanol 95% dalam menghambat radikal bebas DPPH berdasarkan nilai IC ₅₀ yang diukur menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.	Rasio
2	Fraksi kloroform daun jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.)	Hasil fraksinasi ekstrak etanol 95% daun jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.) menggunakan kloroform setelah difraksinasi dengan <i>n</i> -heksan dengan seri konsentrasi 25, 50, 75, 100, dan 125 ppm.	Rasio
3	Ekstrak etanol	Ekstrak kental daun jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.) yang telah dimaserasi dengan etanol 95% selama 5 hari dan remaserasi selama 2 hari.	Nominal
4	Daun jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.)	Daun jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.) yang diambil dari Naimata, kecamatan Maulafa, Kota Kupang.	Nominal
5	Metode DPPH	Metode pengukuran kemampuan fraksi kloroform daun jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.) dalam menghambat radikal bebas DPPH dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.	Rasio
6	Nilai IC ₅₀	Parameter pengukuran aktivitas antioksidan dalam meredam 50% radikal bebas DPPH.	Rasio

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat berupa Spektrofotometer UV-Vis, *vacuum rotary evaporator*, neraca analitik, bejana maserasi, gelas ukur

(pyrex), beaker gelas (pyrex), batang pengaduk labu ukur (pyrex), (pyrex), cawan porselin, micropipet (dragon med) dan pipet tetes.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), etanol 95%, kloroform, kertas perkamen, kertas saring dan kain flanel, tisu (Passeo) dan *aluminium foil*.

H. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan simplisia daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.)

Daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) segar berwarna merah hingga hijau kemerahan digunakan sebagai simplisia. Daun disortasi basah untuk memisahkan kotoran, ranting, dan daun rusak. Setelah disortasi, daun ditimbang sebanyak 1 kg dan dicuci bersih. Daun lalu ditiriskan dan dikeringkan menggunakan metode penganginan. Setelah proses pengeringan selesai, daun ditimbang kembali untuk menentukan Setelah kering, daun ditimbang kembali untuk mengetahui susut keringnya. Daun selanjutnya dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk (Rivai *dkk.*, 2014).

2. Pembuatan ekstrak daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.)

Serbuk simplisia daun jarak merah kemudia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 95%. Sebanyak 250 g serbuk ditimbang dan direndam dalam 1875 mL pelarut. Sampel disimpan dalam wadah yang kedap udara dan terhindar dari paparan cahaya. Sampel direndam selama 6 jam awal dengan sesekali diaduk, kemudian didiamkan

selama 18 jam berikutnya. Proses ini diulang selama 5 hari. Filtrat dipisahkan dari residu menggunakan corong dengan kertas saring. Residu kemudian diremaserasi menggunakan etanol 95% sebanyak 625 mL selama 2 hari. Maserasi dilakukan dua kali untuk memaksimalkan hasil. Filtrat diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

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

3. Pembuatan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jarak merah

Sebanyak 10 g ekstrak etanol 95% daun jarak merah pertama kali dilarutkan dengan air panas sebanyak 50 mL dan difraksinasi dengan *n*-heksan menggunakan corong pisah. Hasil fraksi *n*-heksan dipisahkan dan sisanya ditambahkan dengan kloroform sebanyak 50 mL dan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali dan dikumpulkan kelima pengulangan fraksi pada wadah yang sama. Kemudian hasil fraksinasi dipekatkan hingga mendapat fraksi kental.

4. Uji fitokimia

a. Uji alkaloid

0,5 gram ekstrak kental dicampur dengan 2 mL etanol 70%, selanjutnya diaduk merata. Larutan disaring, filtrat ditambah air panas, dan dibiarkan hingga dingin, setelahnya dilakukan penyaringan ulang. Filtrat kemudian ditetesi 2–3 tetes dengan pereaksi Mayer. Munculnya kekeruhan atau endapan pada larutan merupakan indikasi positif alkaloid. Hasil ini dibandingkan dengan menggunakan pereaksi

Bouchardat dan Dragendorff dan dilihat hasil yang diperoleh, warna coklat yang terbentuk merupakan indikasi positif (Tjitda & Nitbani, 2019).

b. Uji flavonoid

Dilarutkan 0,1 gram ekstrak kental dalam 10 mL etanol, lalu dibagi ke dalam tiga tabung reaksi berbeda: tabung satu berfungsi sebagai kontrol positif, tabung dua diberi tambahan larutan NaOH, sedangkan tabung tiga ditambahkan asam sulfat (H_2SO_4) pekat. Warna pada tabung dua dan tiga diamati lalu dibandingkan dengan kontrol. Adanya perubahan warna mengindikasikan bahwa adanya kandungan flavonoid dalam sampel (Tjitda & Nitbani, 2019).

c. Uji saponin

Ekstrak kental seberat 0,1 gram dilarutkan dengan 15 mL air panas dan lalu dipanaskan selama lima menit. Selanjutnya, campuran disaring dan hasil penyaringan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian dikocok hingga terbentuk busa. Adanya kandungan saponin dalam sampel ditandai dengan busa yang tidak hilang dengan penambahan HCl 2 N dan tetap stabil selama 10 menit (Tjitda & Nitbani, 2019).

d. Uji tannin

Sampel sebanyak 0,1 gram dihomogenkan menggunakan etanol, lalu dimasukan 2–3 tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Adanya warna hijau kehitaman

atau hitam kebiruan atau menunjukkan hasil positif terhadap kandungan tanin (Tjitda & Nitbani, 2019).

5. Uji aktivitas antioksidan

a. Penyiapan larutan uji

Sebanyak 50 mg fraksi kloroform daun jarak merah dilarutkan dalam etanol 95% hingga mencapai batas tanda pada labu ukur 50 mL, sehingga konsentrasi akhir larutan adalah 1000 ppm. Larutan tersebut diencerkan untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi bertingkat yaitu 25, 50, 75, 100, dan 125 ppm.

b. Penyiapan larutan DPPH

Labu ukur dengan volume 50 mL disiapkan dan dimasukkan 10 mg serbuk DPPH dan etanol 95% ditambahkan hingga volume mencapai tanda batas, menghasilkan konsentrasi larutan DPPH 0,5 mM atau setara dengan 200 ppm.

c. Penyiapan larutan pembanding

Dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, vitamin C sebanyak 10 mg dan ditambahkan 5 mL etanol 95% kemudian dihomogenkan, selanjutnya volume ditepatkan hingga mencapai tanda batas dengan etanol 95%. Larutan ini menghasilkan konsentrasi 200 ppm. Selanjutnya, Larutan standar uji dibuat sebagai pembanding dengan kadar konsentrasi bertingkat yaitu 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm.

d. Penentuan panjang gelombang

Sebanyak 4 mL etanol 95% sebagai blanko dimasukkan ke dalam vial,

kemudian dimasukan 1 mL larutan DPPH, didiamkan, dan diukur pada panjang gelombang 510–520 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

e. Pengukuran absorbansi peredaman radikal bebas DPPH

Sebanyak 4 mL blanko, larutan uji, dan larutan pembanding pada masing-masing konsentrasi diambil, lalu sebanyak 1 mL larutan DPPH ditambahkan ke tiap vial. Campuran dihomogenisasi dan setelah didiamkan 30 menit, absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum. Etanol 95% digunakan sebagai blanko.

I. Analisis data

Setelah dilakukan pengukura absorbansi dengan Spektrofotometri UV-Vis kemudian dihitung tingkat peredaman radikal bebas DPPH dinyatakan dalam persen (%), yang dihitung berdasarkan rumus:

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

Keterangan :

Absorbansi blanko : serapan radikal bebas DPPH 0,5 mM

Absorbansi sampel : serapan sampel terhadap radikal bebas 0,5 mM

Persen inhibisi radikal bebas DPPH dari masing-masing larutan kemudian digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} . Analisis ini menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan hasilnya diolah untuk memperoleh persamaan

regresi linear. Kemampuan aktivitas antioksidan dari fraksi kloroform dibandingkan dengan vitamin C.

$$y = a + bx$$

keterangan :

y : presentase aktivitas antioksidan

a : konsentrasi larutan uji

b : tanpa intersep (perpotongan garis disumbu y)

Analisis regresi dilakukan dengan memasukkan data perhitungan, menggunakan konsentrasi fraksi pada sumbu x dan juga pada sumbu y persentase inhibisi. Hasil dari analisis tersebut menghasilkan nilai x yang merupakan nilai IC50 sampel, yang selanjutnya digunakan untuk menentukan tingkat kekuatan aktivitas antioksidannya.