

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

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

B. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan prodi Farmasi menggunakan Spektrofotometri UV-Vis di Laboratorium Farmasi Poltekes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai Mei 2025.

C. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian adalah tanaman daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) yang berasal dari Naimata Kota Kupang.

2. Sampel dan teknik sampling

a. Sampel

Sampel yang di gunakan dalam penelitian ini adalah hasil fraksi etil asetat daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.)

b. Teknik sampling

Teknik sampling yang di gunakan dalam penelitian ini adalah *purposive sampling* yaitu pengambilan sampel yang di dasarkan pada pertimbangan dan karakter tertentu yaitu,daun jarak merah yang berwarna merah hingga hijau kemerahan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah seri konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol 95% daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.)

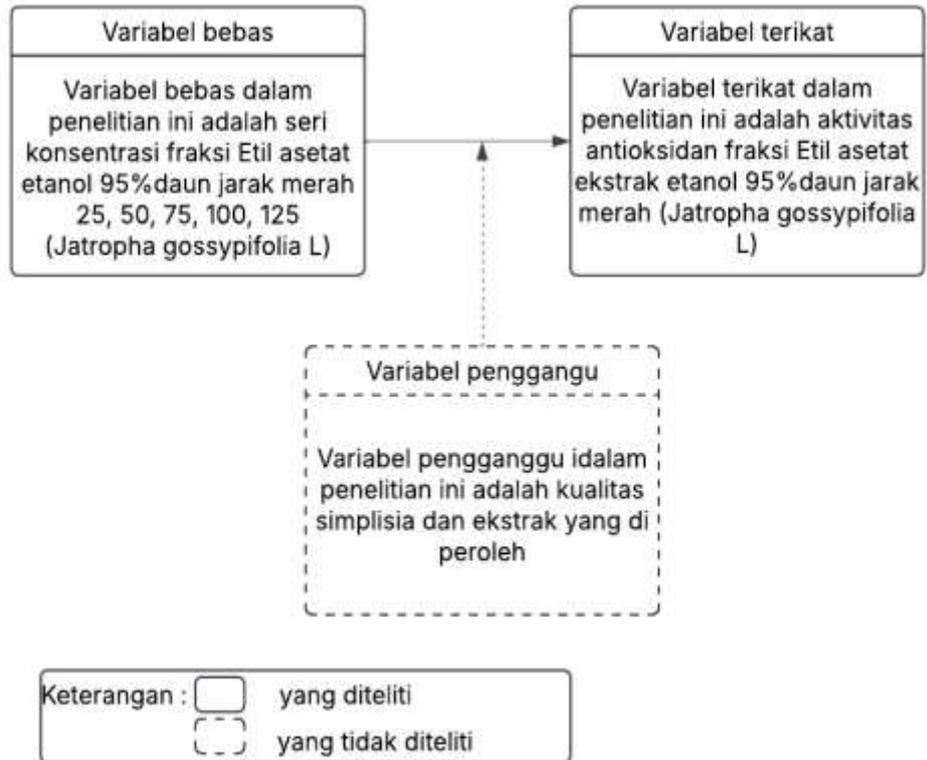
2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol 95% daun jarak merah(*Jatropha gossypifolia* L.)

3. Variabel penganggu

Variabel penganggu dalam penelitian ini adalah kualitas simplisia dan ekstrak yang di peroleh

E. Kerangka Konsep



F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala
1	Aktivitas antioksidan	Kemampuan fraksi etil asetat ekstrak etanol 95% dalam menghambat radikal bebas DPPH berdasarkan nilai IC ₅₀ yang diukur menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.	Rasio
2	Fraksi etil asetat Daun Jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.)	Hasil fraksinasi ekstrak etanol 95% daun jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.) menggunakan etil asetat 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.	Nominal
4	Daun jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.)	Daun jarak merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.) yang diambil dari Naimata Kota kupang.	Nominal
5	Metode DPPH	Metode pengukuran kemampuan fraksi etil asetat 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

Alat yang di gunakan dalam penelitian ini adalah bejana maserasi (wadah kaca) Spektrofotometer UV-VIS, cawan perselin, tabung reaksi, batang pengaduk, gelas kimia, erlenmeyer, corong pisah, labu takar, pipet ukur, pipet volum, sendok tanduk, timbangan analitik, *Rotary Evapotaror*, *Waterbath* (memmert), blender (mespion), ayakan No.100 mesh.

2. Bahan

Bahan yang di gunakan adalah daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L), DPPH (2,2 - *diphenyl -1 -picrylhydrazil* etanol 95% tisu, aluminium foil, kertas perkamen dan kertas saring.

H. Prosedur Penelitian

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

Simplisia yang diambil ialah daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) yang masih segar dan berwarna merah hingga hijau kemerahan. Daun disortasi basah untuk memisahkan daun dari kotoran, ranting dan daun yang rusak hasil sortasi ditimbang sebanyak 1 kg dan dicuci bersih. Setelah itu, hasil sortasi ditiriskan, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Daun yang telah kering ditimbang kembali untuk melihat susut pengeringannya. Daun kemudian diserbuk dengan cara diblender hingga mencapai Herajat kehalusan tertentu (Sapitri Pangestu, 2017)

Serbuk simplisia daun jarak merah diekstrak dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 200 g dengan pelarut sebanyak 200 ml. Sampel kemudian

dimasukan ke dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya matahari. Sampel direndam selama 5 hari kemudian didiamkan selama 18 jam, hasil perendaman dipisahkan antara hasil filtrate dan residu menggunakan corong yang dialasi dengan kertas saring. Sampel dapat diekstrak sebanyak dua kali untuk memaksimalkan hasil penyarian Filtrat, selanjutnya diuapkan hingga mendapatkan ekstrak kental (Kementrian Kesehatan RI, 2017).

2. Pembuatan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jarak merah

Sebanyak 10 g ekstrak etanol 95% daun jarak merah pertama kali dilarutkan dengan air panas sebanyak dan 100 ml dan fraksinasi dengan *n*-heksan menggunakan corong pisah. Hasil fraksi *n*-heksan dipisahkan dan sisanya kemudian ditambahkan dengan Etil asetat sebanyak 100 mL dan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali, dan dikumpulkan kelima pengulangan fraksi pada wadah yang sama. Kemudian hasil fraksinasi di pekatkan hingga mendapatkan fraksi kental.

3. Uji Fitokimia

a. Uji alkaloid

Uji alkaloid ini menggunakan pereaksi Mayer dan Wagner. Sebanyak 0,3 g. fraksi Etil asetat dimasukkan ke dalam cawan porselen, kemudian ditambahkan 5 mL HCl 2 M dan 5 mL Aquades. Campuran ini dipanaskan dalam penangas air selama 5 menit, sampel di dinginkan pada temperature kamar setelah itu di saring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 3 bagian. Filtrat pertama berfungsi sebagai kontrol,filtrat kedua ditambahkan pereaksi Mayer, reaksi positif jika

terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning. Filtrat ke tiga ditambah pereaksi Wagner, reaksi positif jika berwarna coklat muda sampai kuning (Azmin *et al.*, 2019).

b. Uji flavonoid

Sebanyak 0,1 g, diuapkan, dicuci dengan n-heksana hingga terlihat jernih. Sisa ekstrak dilarutkan dalam 20 mL etanol dan disaring. Setelah disaring, larutan dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama dipanaskan menggunakan penangas air, jika terjadi perubahan warna menjadi hijau kekuning-kuningan, ini menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Selanjutnya di tambahkan larutan NaOH 10% jika terjadi warna biru ungu menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Azmin *et al.*, 2019).

c. Uji saponin

Sebanyak 0,1 gram fraksi n-heksan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 15 mL air panas. Setelah didinginkan, campuran dikocok kuat-kuat selama 10 hingga 20 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama setidaknya 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 M, itu menandakan adanya senyawa saponin (Azmin *et al.*, 2019).

d. Uji tanin

Sebanyak 0,1 gram dicampur dengan etanol, lalu ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Indikasi hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Azmin *et al.*, 2019).

4. Uji aktivitas

a. Penyiapan larutan uji

Sebanyak 50 mg fraksi Etil Asetat daun jarak merah dilarutkan dengan etanol 95% sampai tanda batas pada labu ukur 50 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan induk tersebut dibuat seri konsentrasi dengan konsentrasi 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm.

b. Penyiapan larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang 10 mg, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan etanol 95% sampai tanda batas hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,5 Mm atau 200 ppm.

c. Penyiapan larutan pembanding

Larutan pembanding yang digunakan yakni kuersetin larutan pembanding dibuat dengan dimasukkan 10 mg vitamin C ke dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan etanol 95% 5 mL dan dikocok hingga homogen. Campuran ditambahkan dengan etanol 95% sampai tanda batas, untuk memperoleh larutan kuersetin 200 ppm. Larutan tersebut diencerkan menjadi konsentrasi 1,2,3,4 dan 5 ppm.

d. Penentuan Panjang gelombang

Sebanyak 4 mL blanko yaitu etanol 95% dimasukkan ke dalam labu ukur ditambahkan 1mL larutan DPPH, lalu ditutup dan diukur pada panjang gelombang 515-520 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

e. Pengukuran absorbansi peredam radikal bebas DPPH

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

I. Analisa data

Data yang di peroleh dengan Spektrofotometri UV-Vis kemudian dihitung presentase peredaman radikal bebas DPPH. persen (%) peredaman radikal bebass DPPH dihitung dengan rumus:

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

Keterangan:

Abs blanko:serapan radikal bebas DPPH 0,5 Mm

Abs sampel:serapan sampel terhadap radikal bebas 0,5 Mm

Presentase peredaman radikal bebas DPPH dari masing masing larutan fraksi etil asetat etanol daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) serta pembandingnya vitamin C, dianalisis pada Spektrofotometri UV-Vis dan akan di hitung masing masing nilai IC₅₀ dengan rumus analisis

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y : Presentase aktivitas antioksidan

a : Konsentrasi larutan uji

b : Tanpa intersep (perpotongan garis disumbu y)

Hasil perhitungan kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi fraksi sebagai absis (sumbu x) dan nilai presentase peredaman (aktivitas antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y). Hasil analisis regresi linear berupa nilai x, dapat dimasukkan ke dalam rumus $IC_{50} = \text{anti Log}(x)$ dan ditentukan tingkat kekuatan antioksidannya.