

BAB III METODELOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian berjenis eksperimental laboratorium. Metode maserasi memakai pelarut etanol, etil asetat serta n-heksan menggunakan sampel daun jambu biji yang diekstraksi. Hasil ekstraksi yang berupa filtrat selanjutnya dipekatkan hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak etanol, etil asetat serta n-heksan daun jambu biji yang dihasilkan, kemudian dipakai untuk uji pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) dengan parameter yang dipakai yaitu FRAP *value* dengan kuersetin sebagai pembanding. Selain itu, uji kualitatif yakni profil senyawa fitokimia dengan uji tabung (fenolik, alkaloid, tanin, flavonoid, steroid, triterpenoid dan saponin) dan uji KLT (flavonoid).

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Dilaksanakannya penelitian ini berlokasi pada Laboratorium Kimia Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu

Dilaksanakannya penelitian ini di bulan Mei sampai dengan Juli tahun 2022.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang ada di penelitian ini yakni daun jambu biji putih (*P. guajava* L.) diambil di daerah Dusun III, Desa Munggang Sari, Kecamatan Grabag, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah (titik koordinat : -7.828539,109.879769).

2. Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini diambil daun jambu biji mulai dari pucuk daun nomor 5 sampai dengan 10, berwarna hijau serta masih dalam keadaan segar.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas di penelitian ini yakni variasi pelarut etanol, etil asetat dan *n*-heksan.

2. Variabel terikat

Variabel terikat di penelitian ini berupa FRAP *value* tiap ekstrak dinyatakan sebagai nilai mg equivalen FeSO₄/gram sampel

3. Variabel terkendali

Variabel yang dikendalikan di penelitian ini berupa area tumbuh

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun jambu biji diketahui mengandung aktivitas antioksidan diantaranya saponin, flavonoid, tanin, terpenoid, alkaloid dan steroid.
2. Uji FRAP yakni transfer elektron dari reaksi kompleks antioksidan Fe³⁺ menjadi Fe²⁺ dari ekstrak daun jambu biji.
3. Lokasi tumbuh menjadi variabel terkendali karena harus menyesuaikan dengan kondisi tempat untuk bertanam, dan waktu serta suhu pengeringan pada saat pemanasan daun jambu biji.
4. Pengambilan sampel secara acak terkontrol (*random purposive sampling*). Diambil daun yang berukuran seragam, tidak berwarna kecoklatan atau kekuningan melainkan daun utuh berwarna hijau sedang.

F. Alat dan Metode Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Penelitian ini alat yang diperlukan diantaranya adalah: batang pengaduk, grinder (*Fomac*), ayakan 40 mesh, botol ekstrak (vial), cawan porselin, gelas beker (*Iwaki Pyrex*), gelas ukur (*Iwaki Pyrex*), labu takar 50 mL, 25 mL, 5mL (*Iwaki Pyrex*), lemari asam, mikropipet (*eppendorf*), pH-meter, pipet tetes, pipet volume (*Iwaki Pyrex*), propipet, pipet ukur (*Iwaki Pyrex*) tabung reaksi (*Iwaki Pyrex*), timbangan analitik (*Ohaus*), toples kaca, kompor listrik, rak tabung reaksi, sendok spatula, standuk tanduk, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis*), oven (*Memmert type UN-55*), waterbath, vortex (*Ohaus*)

b. Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang diperlukan diantaranya: ekstrak daun jambu biji (*P. guajava* L.), etanol p.a, *n*-heksan p.a, magnesium p.a, natrium asetat trihidrat teknis, asam asetat teknis, etil asetat p.a, akuades teknis, HCl pekat teknis, TPTZ p.a, $\text{FeCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ teknis, metanol p.a., kloroform p.a, Meyer p.a, Wagner p.a, Dragendorff p.a, asam sulfat pekat, FeCl 5%, kertas saring, kuersetin p.a.

2. Pengumpulan bahan dan determinasi tanaman

Sampel penelitian dikumpulkan dengan cara dipilih daun jambu biji yang dari pucuk daun nomor 5 sampai 10, serta masih segar dan berwarna hijau. Uji tanaman (determinasi) dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Determinasi tumbuhan pada daun jambu biji membantu menentukan ketetapan herba daun jambu biji yang ingin dipergunakan untuk penelitian.

3. Persiapan sampel

Diambil daun dari pucuk nomor 5 sampai dengan 10 yang masih segar. Cuci daun sebanyak 5 kg menggunakan air sampai bersih, tiriskan, dikeringkan. Indikator daun dikatakan kering apabila pada saat dilakukan peremasan sudah benar-benar hancur. Daun yang kering ditimbang lagi dan dihaluskan menggunakan alat grinder. Serbuk disaring menggunakan saringan nomor 40 mesh, hal ini dilakukan supaya untuk mengecilkan ukuran partikel dan meningkatkan kontak dengan pelarut. Hasil saringan berupa serbuk halus dikumpulkan lalu ditimbang

4. Metode pembuatan ekstrak daun jambu biji

a. Maserasi

Serbuk daun jambu biji ditimbang masing-masing sebanyak 300 gram kemudian dimasukkan ke dalam toples untuk direndam, menggunakan perbandingan (1:10) dengan jumlah pelarut 3 liter lalu diaduk, ditutup rapat dan didiamkan pada tempat gelap. Pengadukan dilakukan setiap 6 jam sekali dengan tujuan untuk memastikan seluruh permukaan serbuk dapat kontak dengan cairan penyari, sehingga zat aktif dapat terlarut dengan sempurna. Didiamkan pada tempat gelap selama 3 hari dan terhindar dari cahaya matahari agar senyawa antioksidan tidak rusak terkena sinar. Proses selanjutnya filtrat disaring untuk dipisahkan dengan maseratnya menggunakan kain mori kemudian dilakukan remaserasi dalam waktu 24.

b. Kontrol kualitas ekstrak daun jambu biji

1) Nilai rendemen

Perhitungan nilai rendemen ekstrak etanol, etil asetat serta n-heksan daun jambu biji yakni menggunakan rumus:

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

2) Penentuan susut pengeringan

Penentuan susut pengeringan pada ekstrak daun jambu biji yaitu dengan menggunakan alat *moisture balance*, yakni 1 gram serbuk dimasukkan pada *moisture balance* dan ditutup, terlihat hasil dari susut pengeringan yang terkandung pada ekstrak daun jambu biji dengan bentuk presentase.

5. Uji organoleptik

Uji organoleptik bertujuan untuk mengidentifikasi secara objektif terhadap ekstrak yang didapat. Pengujian berupa bau, warna, rasa, dan tekstur.

6. Uji aktivitas fitokimia

Analisis ini dilakukan dengan maksud untuk melihat kandungan metabolit sekunder pada sampel daun jambu biji. Serbuk daun jambu biji telah diuji senyawa kimianya, antara lain pengujian fenolik, flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid (steroid), dan tanin.

a. Identifikasi fenolik

1 mL metanol ditambahkan ke total 0,1 g ekstrak. 5 tetes folin ciocalteu ditambahkan, terbentuknya warna ungu, hijau, biru tua, merah, biru kehitaman atau hijau kehitaman membuktikan hasil positif.

b. Identifikasi flavonoid

Diambil 0,1 g ekstrak dilarutkan pada 2-3 mL metanol kemudian dipanaskan pada penangas air, lalu ditambahkan 0,1 g Magnesium, dan ditambahkan dengan 2 mL HCl pekat. Perolehan dikatakan positif dilihat dengan terjadinya warna merah, kuning atau jingga.

c. Identifikasi alkaloid

Pada identifikasi alkaloid dilakukan 3 pengujian dengan menggunakan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff. Diambil 0,1 gram ekstrak lalu ditambahkan sebanyak 2 mL asam klorida pekat lalu

diayak. Diambil 3 tabung reaksi, setelah itu satu per satu dimasukkan sebanyak 0,5 mL filtrat. Setiap tabung reaksi tambahkan 3 tetes larutan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorf. Dengan terbentuknya endapan putih saat ditambahnya pereaksi Mayer menandakan hasil positif, dengan perubahan warna menjadi merah bata untuk pereaksi Wagner dan dengan endapan berwarna jingga untuk pereaksi Dragendroff.

d. Identifikasi saponin

Diambil 0,1 g ekstrak untuk dimasukkan pada tabung reaksi kemudian tambahkan dengan 10 mL air panas, dinginkan lalu digojog dengan waktu 10 detik dengan kuat. Menunjukkan hasil positif apabila membentuk busa dengan tinggi 1-10 cm dengan waktu kurang lebih 10 menit selesai itu ditetesi menggunakan 1 tetes HCl 2N, busa tidak menghilang.

e. Identifikasi terpenoid (steroid)

Diambil 0,1 g ekstrak ditambahkan menggunakan 2 mL klorofom, selanjutnya ditambahkan 10 tetes larutan asam asetat anhidrat serta 3 tetes asam sulfat pekat. Warna hijau melihasilkan hasil positif untuk steroid. Pada terpenoid bila terjadi warna merah menunjukkan hasilnya positif.

f. Identifikasi tanin

Diambil 0,1 g ekstrak lalu dilakukan pelarutan menggunakan 5 mL air panas. Setelah itu ditambahkan FeCl_3 5% sejumlah 2 sampai 3 tetes, warna biru tua atau hitam kehijauan terbukti hasil positif.

7. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) agar melihat adanya senyawa flavonoid

a. Penjenuhan bejana

Dalam kromatografi lapis tipis pemilihan sistem pelarut yang dipakai didasarkan atas prinsip *like dissolves like*. Pengujian flavonoid

dilakukan dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak berupa kloroform : metanol : *n*-heksan dengan perbandingan (9:1:1), dimasukkan ke dalam sebuah *chamber*. Kertas saring dengan panjang 10 cm dimasukkan *chamber*. Ditutup rapat lalu dibiarkan kertas saring terbatas oleh fase gerak agar menunjukkan *chamber* sudah jenuh.

b. Pembuatan larutan uji

Ditimbang ekstrak daun jambu biji masing-masing ekstrak sebanyak 500 mg, kemudian dilarutkan dalam 5 mL etanol p.a. Pada larutan standar menggunakan kuersetin sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a

c. Prosedur KLT

Dioven selama 3 menit plat KLT pada suhu sekitar 100°C, supaya air yang terkandung pada plat hilang dan daya serap lebih tinggi. Dibuat garis pada bagian atas dan dibawah plat KLT berjarak sekitar 1 cm. Ditotolkan ekstrak daun jambu biji pada garis bawah pada plat KLT sejajar dengan standar kuersetin dengan jarak 1 cm pada keduanya. Setelah itu *chamber* berisikan fase gerak jenuh, dimasukkan plat KLT dan ditutup sampai eluen naik. Dikeringkan plat KLT setelah eluen naik dan diamati noda dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Dihitung nilai Rf (*Retardation factor*).

8. Uji aktivitas antioksidan metode FRAP

a. Penyiapan Larutan Pereaksi

1) Buffer Asetat pH 3,6

Menimbang 775 mg natrium asetat trihidrat ditambah menggunakan 4 mL asam asetat pekat lalu dilarutkan menggunakan akuades sampai 250 mL pada labu takar.

2) TPTZ (*2,4,6-tripyridyl-striazine*)

Dilarutkan 31 mg TPTZ pada 10 mL HCl 40 mmol/L pada labu takar 10 mL.

3) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Menimbang 32,44 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ lalu dilarutkan menggunakan buffer asetat kedalam labu takar sampai 10 mL.

4) Reagen FRAP

Dibuat dengan perbandingan (10:1:1) dengan cara dilarutkan buffer asetat pH 3,6 sebanyak 10 mL; larutan TPTZ sebanyak 1 mL dan larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1 mL kemudian dihomogenkan. Reagen FRAP dicukupkan dalam 100 mL menggunakan akuades.

b. Pembuatan larutan induk dan seri kadar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Ditimbang 25 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 25 mL sampai diperoleh konsentrasi 1000 ppm. dibuat larutan seri kadar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200, 300, 400, 500 dan 600 ppm dengan cara dipipet 1, 2, 3, 4, dan 5 mL dicukupkan dengan akuades dalam labu ukur 5 mL sampai tanda batas atas.

c. Penentuan panjang gelombang maksimal

Dipipet 1 mL larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 1000 ppm, ditambahkan 3 mL reagen FRAP dilakukan *scanning* panjang gelombang maksimal menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan range 580-610 nm, dan diperoleh Panjang gelombang pada 595 nm.

d. Penentuan *Operating time*

Dipipet 1 mL larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 1000 ppm, ditambahkan 3 mL reagen FRAP dilakukan penentuan *operating time* menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm dengan interval waktu 45 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil dan diperoleh pada menit ke 30.

e. Penentuan aktivitas antioksidan kuersetin

Diambil 1 mg kuersetin dan timbang lalu dilarutkan menggunakan etanol hingga tercampur pada labu ukur 10 mL. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 12 ppm, 14 ppm, 16 ppm, 18 ppm dan 20 ppm. Dimasukkan kedalam labu ukur kemudian dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya menggunakan etanol hingga tanda batas. Setiap larutan uji diambil 1 mL masukkan pada tabung reaksi dan tambahkan 3 mL reagen FRAP, ditutup menggunakan aluminium foil digojog sampai tercampur. Didiamkan pada suhu ruang dengan waktu yang telah ditentukan. Memakai metode spektrofotometri UV-Vis nilai absorbansi ditentukan dengan panjang gelombang.

f. Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak daun jambu biji

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang dan dilarutkan masing-masing pada 10 mL etanol, etil asetat serta *n*-heksan lalu digojog sampai tercampur. Seri konsentrasi larutan ekstrak pelarut etanol dibuat 12 ppm, 14 ppm, 16 ppm, 18 ppm dan 20 ppm, larutan ekstrak pelarut etil asetat dibuat 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm, 16 ppm dan 18 ppm dan larutan ekstrak pelarut *n*-heksan dibuat 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm dan 16 ppm. Selanjutnya masukkan pada labu ukur 5 mL kemudian sampai batas atas volumenya menggunakan pelarut etanol p.a lalu digojog hingga tercampur. Setiap larutan uji diambil 1 mL masukkan pada tabung reaksi dengan menambahkan 3 mL FRAP digojog sampai tercampur lalu didiamkan pada tabung reaksi dengan ditutup menggunakan aluminium foil pada suhu ruang dan tempat yang gelap. Selanjutnya ditentukan nilai absorbansi dengan panjang gelombang 595 nm, dilakukan 3x replikasi.

G. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Metode pengolahan serta analisis data dilakukan menggunakan cara:

1. Nilai rendemen ekstrak

Dengan membagi berat ekstrak pekat yang didapatkan dengan berat sampel awal (berat simplisia) dan dikalikan 100%, nilai rendemen akan diperoleh.

2. KLT

Plat KLT ditotolkan standar kuersetin dan masing-masing ekstrak pada garis bawah dengan jarak 1 cm, setelah *chamber* yang berisi fase gerak jenuh kemudian dimasukkan plat KLT, ditutup hingga eluen naik sampai tanda batas. Diambil lalu dikeringkan plat KLT untuk mengamati noda dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Untuk mencari nilai Rf, dengan cara mengukur jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi jarak yang ditempuh oleh pelarut.

3. Penentuan aktivitas antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menghitung data absorbansi pada ketiga ekstrak dan kuersetin sebagai pembanding. Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan larutan baku standar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sehingga didapatkan kurva kalibrasi regresi linear yang digunakan untuk menghitung konsentrasi, $y = bx + a$, dimana (y) sebagai absorbansi untuk setiap sampel, dan (x) sebagai konsentrasi yang akan dicari. Setelah didapatkan konsentrasi selanjutnya dilakukan perhitungan FRAP *value*, dimana semakin tinggi nilai FRAP *value* maka kapasitas sampel untuk mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} akan semakin meningkat sehingga aktivitas antioksidan dari sampel akan semakin kuat. Perhitungan FRAP *value* dilakukan dengan menggunakan persamaan:

$$\text{FRAP value: } \frac{C \times V \times F_p}{\text{Bobot sampel}}$$

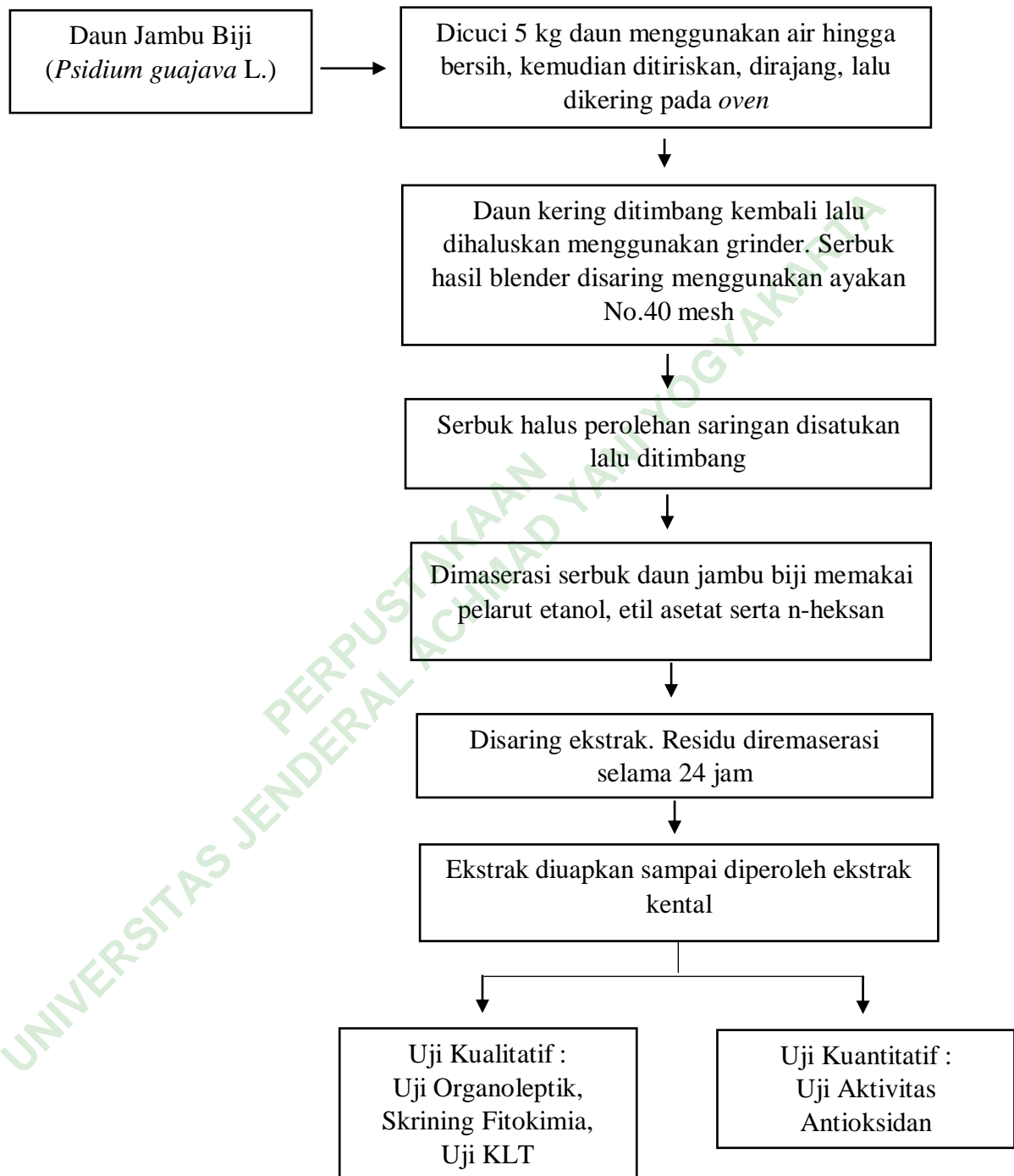
Keterangan:

- C : konsentrasi sampel atau nilai x (mg/L)
 V : volume cuplikan yang digunakan (mL)
 F_p : faktor pengenceran
 Berat sampel : berat sampel yang digunakan (mg)

4. Uji statistik

Dilakukan perhitungan statistika ekstrak daun jambu biji menggunakan aplikasi *Statistical Analysis Software* (SPSS). Menentukan data yang terkumpul terdistribusi normal atau tidak dengan dilakukannya uji prasyarat yaitu uji normalitas dan homogenitas.

Menggunakan metode *Shapiro-wilk* uji normalitas dapat diketahui apakah nilai FRAP *value* ekstrak daun jambu biji dan kuersetin signifikan ($p > 0,05$). Hasil dari standar kuersetin dengan nilai 0,294; ekstrak etanol 0,457; ekstrak etil asetat 0,241 dan ekstrak *n*-heksan 0,820. Setelah itu dengan metode *levene's* dilakukan uji homogenitas. Jika $> 0,05$ maka data dapat dibilang homogen, yang mana pada hasil uji diperoleh nilai 0,519. Oleh karena itu bisa diteruskan memakai uji *One Way Anova*. Dikatakan signifikan apabila nilai yang diperoleh $< 0,05$ dimana hasil uji dengan nilai 0,048 maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test*. Uji *post Hoc Test* digunakan untuk membandingkan kelompok manakah yang berbeda antara sifat pelarut pada ekstrak daun jambu biji dengan pembanding kuersetin.



Gambar 4. Skema Pelaksanaan Penelitian