

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan sampel daun jambu biji varietas album (*Psidium guajava* L.). Sampel diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol 50% dan 100%. Dilakukan remaserasi sebanyak 6 kali sampai maserat terakhir tidak berwarna pekat lagi. Hasil dari ekstraksi (ekstrak) disaring kemudian diuapkan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental difraksinasi menggunakan tiga pelarut: air, etil asetat, dan *n*-heksan. Proses pemisahan menggunakan corong pisah bertujuan untuk menarik dan mengekstraksi senyawa yang lebih spesifik berdasarkan polaritasnya. Hasil fraksinasi diuapkan pada penangas air untuk mendapatkan fraksi yang kental. Uji skrining fitokimia dilakukan uji tabung (alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, saponin, steroid/triterpenoid) dari fraksi air, etil asetat, *n*-heksan ekstrak metanol 50% dan 100% daun jambu biji, dan di uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) yang dinyatakan dengan nilai IC<sub>50</sub>.

#### **B. Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang diambil dari tempat budidaya di Kecamatan Grabag, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah dan dipanen waktu pagi hari.

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

1. Lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2022 hingga Maret 2023

#### D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi konsentrasi dari fraksi ekstrak metanol konsentrasi 50% dan 100% daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu aktivitas antioksidan yang dinyatakan dengan nilai  $IC_{50}$ , dan hasil skrining fitokimia uji tabung.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu waktu panen, pemilihan daun, dan suhu pengeringan.

#### E. Definisi Operasional

1. Ekstrak metanol daun jambu biji adalah ekstrak yang diperoleh dari maserasi serbuk daun jambu biji menggunakan pelarut metanol 50% dan 100%.
2. Fraksi air, etil asetat, dan *n*-heksan adalah fraksi yang diperoleh dari fraksinasi (menggunakan corong pisah) ekstrak metanol 50% dan 100% daun jambu biji menggunakan larutan penyari air, etil asetat, dan *n*-heksan.
3. Metanol 50% dibuat dengan pengenceran antara metanol 100% dan air.
4. Metanol 100% merupakan metanol 96%.
5.  $IC_{50}$  adalah konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50%.

#### F. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Alat yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak metanol daun jambu biji putih yaitu oven, blender, timbangan analitik (*Ohaus*), tempat maserasi (botol kaca transparan), penangas, batang pengaduk, saringan dan alat gelas.
- b. Alat yang digunakan dalam proses fraksinasi yaitu corong pisah, statif dan klem, corong (*pyrex*) dan alat gelas.

- c. Alat yang digunakan untuk uji skrining fitokimia yaitu tabung reaksi, rak tabung, penjepit tabung reaksi, plat tetes, spatula, hot plate, penangas air, alat gelas dan pipet tetes.
  - d. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan yaitu timbangan analitik (*Ohaus*), spatula, alat gelas, vortex, vial, mikro pipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *stopwatch*, dan spektrofotometer UV-Vis Genesys.
2. Bahan
- a. Bahan dalam proses pembuatan ekstrak metanol daun jambu biji yaitu daun jambu biji dan pelarut metanol konsentrasi 50% dan 100% teknis.
  - b. Bahan dalam proses fraksinasi yaitu ekstrak metanol 50% dan 100% daun jambu biji, air, etil asetat *p.a.*, dan *n*-heksan *p.a.*
  - c. Bahan pada uji skrining fitokimia uji tabung yaitu fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan dari ekstrak metanol 50% dan 100% daun jambu biji, HCl (Asam Klorida), aquades, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendorff, Serbuk Magnesium (Mg), reagen *Folin-Ciocalteu*, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Natrium Karbonat) 7,5 %, FeCl<sub>3</sub> (Besi (III) Klorida) 5%, CH<sub>3</sub>COOH (asam asetat glasial), dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (asam sulfat).
  - d. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan yaitu fraksi air, etil asetat, dan *n*-heksan ekstrak metanol 50% dan 100% daun jambu biji, metanol *p.a.*, serbuk DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), kuersetin, dan kertas label.

### G. Pelaksanaan Penelitian

#### 1. Determinasi tanaman

Determinasi daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dilakukan di Fakultas Biologi Laboratorium Sistematika Tumbuhan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

#### 2. Preparasi sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jambu biji yang dipanen di Kecamatan Grabag, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah. Diambil daun jambu biji yang masih segar berwarna hijau muda, bagian daun yang digunakan adalah daun pada bagian ke 5-12 dari pucuk. Daun yang telah

dipanen, dicuci dengan air mengalir hingga bersih dengan tujuan menghilangkan debu dan kotoran yang melekat kemudian kemudian dirajang menjadi bagian yang lebih kecil untuk memudahkan dalam proses pengeringan kemudian daun dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 7 hari. Proses ini dilakukan pada suhu tersebut untuk menjaga senyawa aktif yang terkandung tidak rusak karena pemanasan. Daun jambu biji kering dihaluskan dengan cara diblender hingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan 40 mesh hingga menjadi serbuk halus. Pembuatan serbuk bertujuan untuk memperkecil ukuran simplisia, sehingga luas permukaannya menjadi lebih besar dan kontak antara simplisia dan cairan penyari akan semakin besar (Anjaswati *et al.*, 2021 dengan beberapa modifikasi).

3. Cara membuat metanol 50% dan 100%

Sebanyak 500 mL metanol 100% dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian ditambah air ad 1000 mL, selanjutnya digojog sampai homogen. Metanol 100% adalah metanol 96% yang dianggap sebagai metanol 100%.

4. Ekstraksi dan fraksinasi sampel

Metode ekstraksi yang digunakan mengacu pada metode ekstraksi (Sosalia *et al.*, 2021 dengan beberapa modifikasi):

a. Ekstraksi sampel

Sebanyak masing-masing 250 gram serbuk simplisia daun jambu biji diekstraksi dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:10 dalam pelarut metanol 50% dan 100%. Serbuk simplisia daun jambu biji dimasukkan dalam bejana tertutup, lalu ditambahkan pelarut metanol 50% dan 100% sebanyak 2,5 L untuk merendam seluruh sampel. Sampel yang telah diberi pelarut ditutup dengan rapat dan disimpan ditempat gelap terhindar dari sinar matahari langsung. Sampel direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk dan diamkan selama 18 jam, selanjutnya dilakukan pengadukan tiap 8 jam selama 24 jam. Perendaman pada saat maserasi dilakukan selama 5 hari dan setelah itu disaring (ekstrak I), selanjutnya dilakukan remaserasi dengan 1250 mL pelarut metanol 50% dan 100% sebanyak enam kali sampai ekstrak tidak berwarna pekat lagi.

Perendaman pada saat remaserasi dilakukan selama 6 hari dan diaduk setiap 8 jam selama 24 jam. Hasil ekstrak yang diperoleh dijadikan satu dan dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian dihitung persentase rendemen dengan membandingkan berat ekstrak kental yang diperoleh terhadap berat serbuk simplisia dikali seratus persen.

b. Fraksinasi sampel

Metode fraksinasi yang digunakan mengacu pada metode fraksinasi (Maravirnadita, 2019 dengan beberapa modifikasi):

Ekstrak metanol daun jambu biji difraksinasi secara bertingkat menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Ditimbang sebanyak 5 gram ekstrak kental metanol 50% dan 100%, kemudian dilarutkan dalam 50 mL air lalu diaduk hingga homogen dan difraksinasi dengan *n*-heksan sebanyak 50 mL, digojog kurang lebih 5 menit dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Setelah terbentuk 2 lapisan, masing-masing lapisan dikeluarkan dari corong pisah sehingga didapatkan residu dan fraksi *n*-heksan. Fraksinasi pada pelarut *n*-heksan dilakukan sebanyak 2 kali hingga didapatkan lapisan berwarna tidak pekat lagi. Selanjutnya lapisan air (residu) ditempatkan dalam corong pisah kemudian ditambahkan 50 mL etil asetat lalu digojog kurang lebih 5 menit dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Setelah terbentuk 2 lapisan, masing-masing lapisan dikeluarkan dari corong pisah sehingga didapatkan fraksi air dan fraksi etil asetat. Fraksinasi pada pelarut etil asetat dilakukan sebanyak 3 kali hingga didapatkan lapisan berwarna tidak pekat lagi. Selanjutnya, hasil fraksinasi setiap pelarut diuapkan dengan *waterbath* pada suhu 50°C untuk didapatkan fraksi air, etil asetat, dan *n*-heksan.

5. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan uji tabung dan plat tetes yaitu mereaksikan sampel dengan larutan pereaksi spesifik untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel. Pengujian ini dilakukan pada sampel fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan konsentrasi 50% dan 100%.

a. Identifikasi alkaloid

Ditambahkan 1 mL asam klorida, 1 mL aquades dan 5 tetes fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan ke dalam tabung reaksi, dipanaskan selama 2 menit, kemudian didinginkan lalu disaring. Dibagi filtrat ke dalam 3 plat tetes.

Ditambahkan pereaksi Mayer pada plat tetes pertama, hasil dinyatakan positif jika terbentuk endapan putih. Ditambahkan pereaksi Bouchardat pada plat tetes kedua, hasil dinyatakan positif jika terbentuk endapan coklat kehitaman. Ditambahkan pereaksi Dragendorff pada plat tetes ketiga hasil dinyatakan positif jika terbentuk endapan kuning jingga (Agustina, 2016 dengan beberapa modifikasi).

b. Identifikasi flavonoid

Sejumlah 3 tetes fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan dimasukkan ke dalam plat tetes kemudian ditambahkan 10 mg serbuk Mg dan ditunggu sampai serbuk Mg homogen dengan ekstrak. Lalu tambahkan sebanyak 2-3 tetes asam klorida secara perlahan. Hasil dinyatakan positif mengandung flavonoid jika terbentuk warna merah atau kuning dalam kurun waktu 3 menit (Tasmin *et al.*, 2014).

c. Identifikasi fenolik

Sejumlah 2-3 tetes fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan dimasukkan ke dalam plat tetes dan tambahkan dengan 3-4 tetes Folin-Ciocalteu, diamkan selama 8 menit lalu tambahkan 3-4 tetes mL natrium karbonat 7,5%. Hasil positif menunjukkan terbentuknya warna biru (Rollando, 2018 dengan beberapa modifikasi).

d. Identifikasi tanin

Sejumlah 2-3 tetes fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan dimasukkan ke dalam plat tetes dan tambahkan 3 tetes besi (III) klorida 5%. Dinyatakan positif terhadap tanin jika terbentuknya warna hijau kehitaman (Sosalia *et al.*, 2021 dengan beberapa modifikasi).

e. Identifikasi saponin

Sejumlah 10-20 tetes fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan dimasukkan dalam tabung reaksi lalu tambahkan 2 mL aquades dan kocok secara

vertikal selama 1 menit, diamkan selama  $\pm$  3 menit. Hasil positif terhadap saponin jika diperoleh buih setinggi 2-3 cm (Muthmainnah B, 2017 dengan beberapa modifikasi).

f. Identifikasi terpenoid/ steroid

Sejumlah 2-3 tetes fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan, kemudian larutkan dalam 3-4 tetes asam asetat glasial, kemudian tambahkan 3-4 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Amati perubahan yang terjadi. Terpenoid memberikan hasil positif bila sampel berubah menjadi merah atau kuning, sedangkan adanya steroid ditunjukkan dengan perubahan warna pada sampel yang berubah menjadi biru atau ungu (Satiyarti *et al.*, 2019 dengan beberapa modifikasi).

6. Uji aktivitas antioksidan

Pengaruh konsentrasi metanol terhadap aktivitas peredaman radikal bebas dari fraksi ekstrak daun jambu biji putih dilakukan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dengan kuersetin sebagai kontrol positif.

a. Pembuatan larutan stok DPPH 0,1 mM

Ditimbang sebanyak 3,94 mg serbuk DPPH lalu dilarutkan dalam 100 mL metanol *p.a.*, sehingga didapatkan konsentrasi stok DPPH 0,1 mM. Larutan stok disimpan dalam wadah gelap (Molyneux, 2004).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Dipipet sebanyak 2 mL larutan DPPH 0,1 mM, lalu dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 450-550 nm (Gandjar dan Rohman, 2007) dengan beberapa modifikasi. Panjang gelombang maksimal ditentukan berdasarkan absorbansi tertinggi yang diperoleh pada rentang panjang gelombang tersebut. Panjang gelombang yang didapatkan yaitu 516 nm. (Sosalia *et al.*, 2021 dengan beberapa modifikasi).

c. Penentuan *operating time*

Diambil sebanyak 1 mL larutan induk kuersetin 2 ppm, kemudian tambahkan 2 mL larutan stok DPPH 0,1 mM, homogenkan. *Operating time* ditentukan dengan cara membaca absorbansi campuran kuersetin dan DPPH tersebut dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada

panjang gelombang maksimum 516 nm selama 45 menit. Absorbansi dibaca tiap interval 1 menit. *Operating time* yang didapatkan yaitu 26 menit. (Puspitasari *et al.*, 2019 dengan beberapa modifikasi).

d. Pembuatan absorbansi kontrol (DPPH)

Larutan DPPH dibuat dengan cara menimbang 3,94 mg serbuk DPPH dilarutkan dalam 100 mL metanol *p.a.* selanjutnya dicek absorbansi DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 516 nm.

e. Pembuatan larutan standar kuersetin

Larutan standar kuersetin dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm dengan cara menimbang 10 mg kuersetin dilarutkan dalam 10 mL metanol *p.a.* kemudian divortex. (Wulandari *et al.*, 2015 dengan beberapa modifikasi).

f. Pembuatan larutan seri konsentrasi kuersetin

Dibuat seri dengan konsentrasi 2,4,6, 8, dan 10 ppm dengan cara dipipet larutan kuersetin 1000 ppm sebanyak 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 mL. Kemudian dilarutkan dengan metanol *p.a.* dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. (Sosalia *et al.*, 2021 dengan beberapa modifikasi).

g. Pembuatan larutan uji dari masing-masing fraksi

Dibuat larutan induk 5000 ppm fraksi air dan etil asetat metanol 50% dan 100% dengan cara ditimbang 50 mg fraksi dan dilarutkan dalam 10 mL metanol *p.a.*, dibuat larutan induk 500.000 ppm fraksi *n*-heksan 50% dengan cara ditimbang 12,5 gram fraksi dilarutkan dalam 25 mL metanol *p.a.*, dan dibuat larutan induk 10.000 ppm fraksi *n*-heksan metanol 100% dengan cara ditimbang 250 mg fraksi dan dilarutkan dalam 25 mL metanol *p.a.* adanya perbedaan pada larutan induk pada masing-masing fraksi karena larutan induk harus lebih besar dari pada seri konsentrasi. (Wulandari *et al.*, 2015 dengan beberapa modifikasi).

Dibuat seri konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm dengan cara mengambil larutan induk fraksi air dan etil asetat metanol 50% dan 100% sebanyak 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, dan 1 mL dan dilarutkan dalam metanol *p.a.*



hingga 10 mL, untuk fraksi *n*-heksan 50% dibuat seri konsentrasi 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, dan 500.000 ppm dengan cara diambil 1, 2, 3, 4, dan 5 mL dan dilarutkan dalam metanol *p.a* hingga 5 mL, dan untuk fraksi *n*-heksan 100% dibuat seri konsentrasi 1000, 2500, 3000, 5500, dan 7000 ppm dengan cara diambil 1, 2,5, 4, 5,5, dan 7 mL dan dilarutkan dalam metanol *p.a* hingga 10 mL. Adanya perbedaan seri konsentrasi (ppm) tiap fraksi karena setengah dari absorbansi DPPH harus ada pada seri konsentrasi. (Wulandari *et al.*, 2015 dengan beberapa modifikasi).

h. Pengukuran absorbansi larutan pembanding (kuersetin)

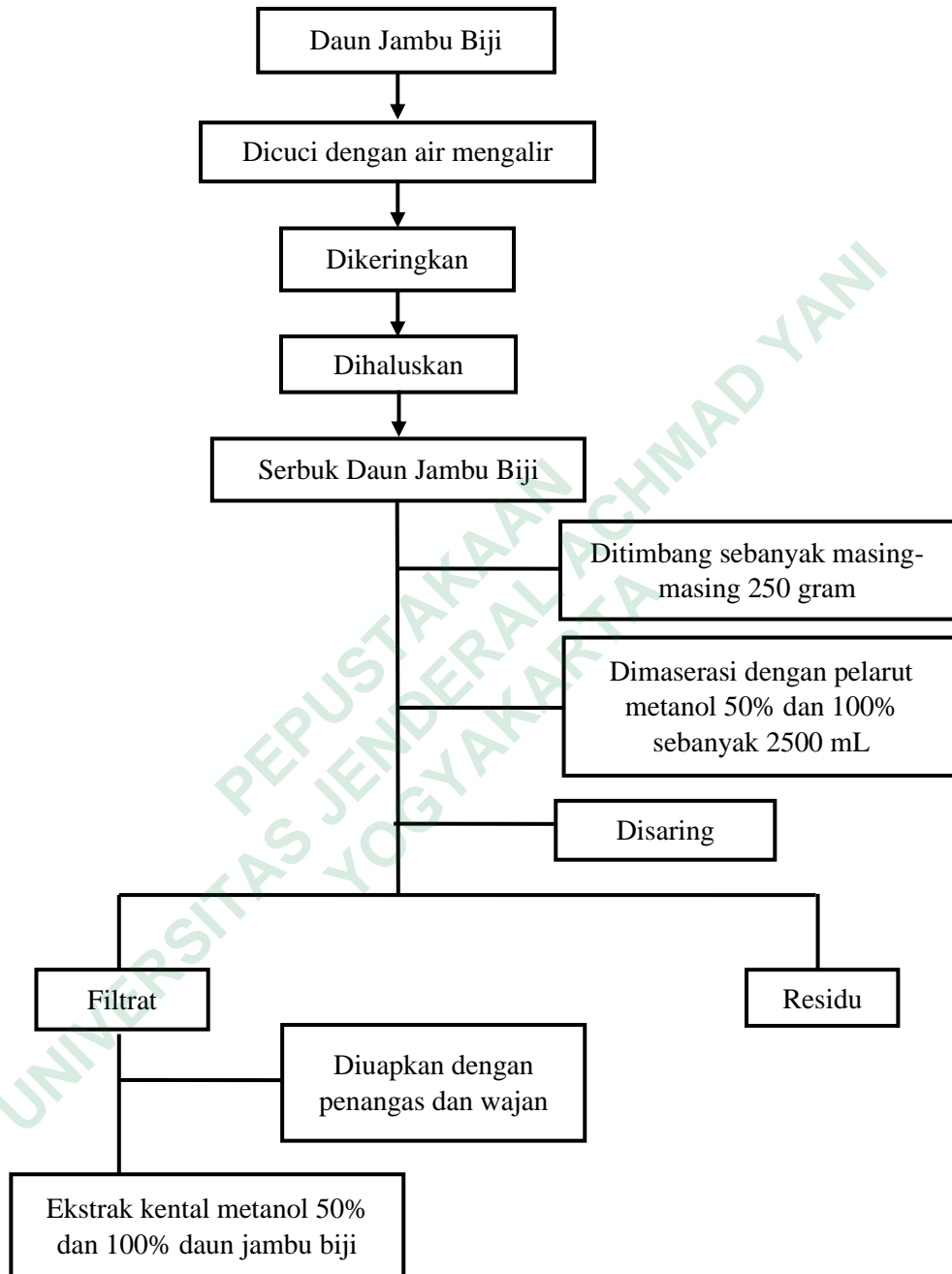
Dipipet sebanyak 1 mL dari konsentrasi 2,4,6, 8, dan 10 ppm yang telah dibuat lalu ditambahkan dengan 2 mL DPPH, homogenkan. Campuran didiamkan selama 26 menit dan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis panjang gelombang 516 nm, lakukan replikasi sebanyak 3 kali (Wulandari *et al.*, 2015 dengan beberapa modifikasi).

i. Pengukuran absorbansi larutan uji dari masing-masing fraksi

Dipipet sebanyak 1 mL larutan uji dari konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm fraksi air dan etil asetat metanol 50% dan 100%, fraksi *n*-heksan 50% dibuat seri konsentrasi 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, dan 500.000 ppm dan fraksi *n*-heksan 100% dibuat seri konsentrasi 1000, 2500, 3000, 5500, dan 7000 ppm yang telah dibuat kemudian ditambahkan 2 mL DPPH, homogenkan. Campuran didiamkan selama 26 menit dan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm, lakukan replikasi sebanyak 3 kali. (Wulandari *et al.*, 2015 dengan beberapa modifikasi).

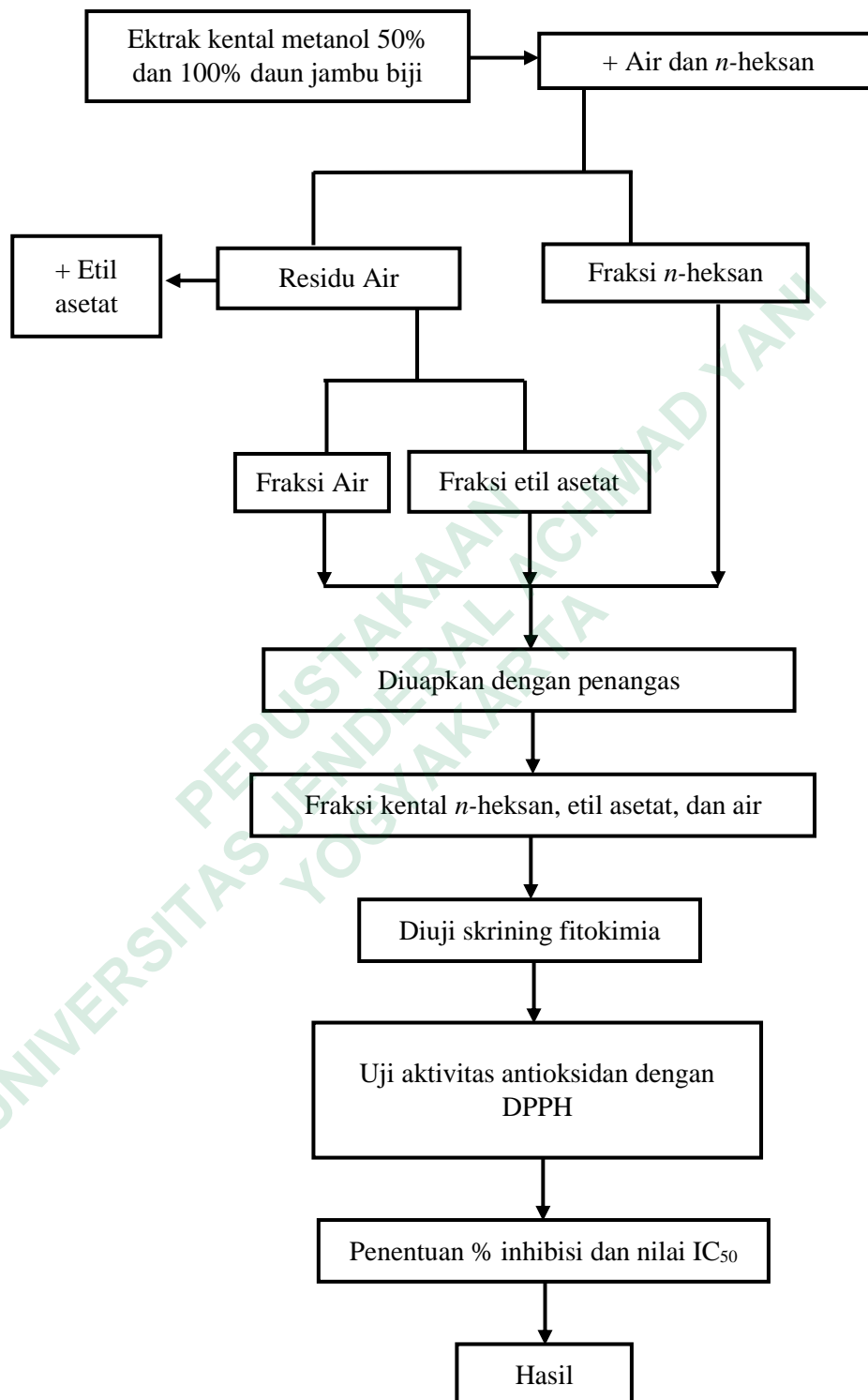
## 7. Pelaksanaan penelitian

## a. Pembuatan Ekstrak



Gambar 4. Skema Tahap Pembuatan Ekstrak

## b. Fraksinasi, Pengujian, dan Analisis Hasil



Gambar 5. Skema Tahap Fraksinasi, Pengujian, dan Analisis Hasil

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun jambu biji dengan fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan berupa data absorbansi masing-masing seri konsentrasi sampel dan standar. Standar yang digunakan yaitu kuersetin. Dikumpulkan data absorbansi dan dihitung persentase (%) inhibisi menggunakan rumus berikut (Maravirnadita, 2019):

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

Hasil perhitungan % inhibisi kemudian dibuat dalam persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel (sumbu x) versus persentase (%) inhibisi (sumbu y). Persamaan regresi linier yang diperoleh, digunakan untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub>. Data tersebut kemudian dapat diklasifikasikan ke dalam kategori antioksidan berdasarkan nilai IC<sub>50</sub>. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub>, maka semakin kuat aktivitas antioksidannya. Menurut Putri dan Hidajati, (2015) antioksidan dibagi menjadi beberapa tingkat kekuatan yaitu :

**Tabel 3. Kategori Antioksidan**

Kategori	IC <sub>50</sub> (ppm)
Sangat kuat	< 50
Kuat	50-100
Sedang	100-250
Lemah	250-500

Data IC<sub>50</sub> yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik menggunakan SPSS. Yang pertama dilakukan uji distribusi normal dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk, kemudian dilanjutkan uji homogenitas dengan menggunakan uji Levene's. Karena data yang dihasilkan tidak berdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *post Hoc Pairwise Comparisons* untuk mengetahui sampel mana yang berbeda signifikansinya. Jika signifikansinya >0,05 maka tidak terdapat sampel yang berbeda signifikan, namun jika signifikansinya <0,05 maka terdapat sampel yang berbeda signifikan.