BAB III
METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif pada penelitian ini adalah skrining fitokimia dan kuantitatif adalah uji kadar flavonoid total. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi daun jeruk nipis terhadap kadar flavonoid total dengan metode spektrofotometri UV-Vis

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, pada bulan Juni hingga Juli 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

   Daun jeruk nipis diperoleh dari Sumber Batikan, Trirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

2. Sampel

   Daun yang digunakan sebagai sampel dipilih daun jeruk nipis yang tua, berwarna hijau, daun yang utuh serta tidak berlubang atau sobek. Daun diambil pada urutan keempat sampai ke tujuh tiap ranting dari pucuk. (Pratiwi, 2021).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

   Variabel bebas untuk penelitian ini ialah metode ekstraksi maserasi dan UAE.

2. Variabel Terikat

   Variabel terikat pada penelitian ini ialah kadar flavonoid total.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini ialah kriteria daun, tempat tumbuh, suhu dan waktu pengeringan, suhu dan waktu ekstraksi, pelarut ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak Daun Jeruk Nipis

Esktrak merupakan hasil yang diperoleh dari proses ekstraksi simplisia dari daun jeruk nipis menggunakan metode maserasi dan UAE. Simplisia daun jeruk nipis berasal dari Sumber Batikan, Trirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

2. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia merupakan serangkaian prosedur laboratorium yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi senyawa fitokima dalam tumbuhan atau eksrak tumbuhan yang bertujuan mendeteksi keberadaan senyawa bioaktif seperti fenolik, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan terpenoid.

3. Kadar Flavonoid Total

Kadar flavonoid total merupakan jumlah senyawa yang dapat diidentifikasi dari suatu tumbuhan melalui analisis kuantitatif yang dinyatakan dalam satuan mg QE (*Quercetin Equivalen*)/g sampel dengan menggunakan standar baku kuersetin.

4. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang digunakan untuk mengekstraksi serbuk tanaman dengan pelarut yang sesuai dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar dan terlindungi dari cahaya.

5. UAE

UAE merupakan metode ekstraksi serbuk tanaman dengan perambatan energi melalui gelombang ultrasonik dengan menggunakan cairan sebagai media yang dapat meningkatkan intensitas perpindahan energi sehingga ekstraksi lebih maksimal.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan 40 mesh, alumunium foil, *beaker glass*, corong kaca, cawan porselin, erlenmeyer 500 mL, grinder, gunting, gelas ukur, kompor listrik, lemari pendingin, labu takar 500 mL, mikropipet, pipet volume, pipet tetes, pH meter, pipet, rak tabung reaksi, spatula, spektrofotometer UV-Vis (Thermo), sarbet, sonikator (*Cole Parmer Waterbath Sonicator*), toples kaca, tabung reaksi, termometer, timbangan analitik, vakum, *vortex mixer*, dan *waterbath*.

2. Bahan

Aquadest, $AlCl_3$, amonia, CH_3COOK5%, corong kaca, etanol (p.a Sigma), $FeCl_3$, HCl, kuersetin (Sigma), kertas saring, kertas label, $NaNO_2$, Na_2CO_3, NaOH, reagen Mayer, reagen Wagner, reagen Dragendroff, reagen Bouchardat, simplisia daun jeruk nipis, *blue tip, white tip,* dan *yellow tip*, tisu.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi

Determinasi daun jeruk nipis dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. Determinasi bertujuan untuk menentukan benar tidaknya tanaman yang dipakai dengan yang diinginkan yaitu spesies *Citrus aurantifolia*.

2. Preparasi Sampel

Sebanyak 2 kg daun jeruk nipis dipanen dari Sumber Batikan, Trirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Sampel yang dipilih daun jeruk nipis yang tua, berwarna hijau, daun yang utuh serta tidak berlubang atau sobek. Daun diambil pada urutan keempat sampai ke tujuh tiap ranting dari pucuk. Kemudian disortasi basah guna membersihkan kotoran yang menempel, ditiriskan kemudian dikeringkan di oven pada suhu 50°C selama 3 hari. Simplisia yang telah kering dihaluskan menggunakan grinder setelah itu diayak dengan ayakan 40 mesh untuk mendapatkan serbuk yang seragam (Pratiwi, 2021).

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

3. Ekstraksi Daun Jeruk Nipis

a. Maserasi

Sebanyak 100 g serbuk simplisia daun jeruk nipis ditambahkan 1000 mL pelarut etanol 96% di dalam toples selama 3 hari, tiap 24 jam dilakukan pengadukan selama 10 menit dan disimpan pada tempat yang terlindungi dari cahaya matahari pada suhu ruang. Selanjutnya hasil rendaman disaring menggunakan kertas saring dengan bantuan corong kaca dan vakum hingga didapatkan filtrat (1). Ampas diremaserasi dengan 500 mL etanol 96% selama 1 hari dengan pengadukan selama 10 menit, kemudian disaring hingga didapatkan filtrat(2). Kemudian filtrat 1 dan 2 digabungkan dan dipekatkan dengan kompor listrik pada suhu 50℃ selama 1 hari sampai diperoleh ekstrak kental (Puspitasari & Proyogo, 2013). Hasil ekstrak ditimbang dengan cawan porselin yang sudah ditimbang, dihitung nilai rendemennya. Ekstrak dihitung nilai randemen dengan menggunakan persamaan 1.

$$\%\text{Rendemen} = \frac{Bobot\ ekstrak\ (akhir)}{Bobot\ simplisia\ (awal)} \times 100\% \quad \text{.....(1)}$$

b. UAE

Sebanyak 100 g serbuk simplisia ditambahkan 1000 mL menggunakan 2 wadah erlenmeyer 500 mL. Kemudian dilakukan ekstrasksi menggunakan sonikator selama 60 menit pada suhu 25℃ (Candra, *et al*., 2021). Disaring ekstrak dengan kertas saring dan bantuan corong buchner dan vakum hingga diperoleh filtrat (1). Ampas diekstraksi kembali dengan 500 mL etanol 96% selama 60 menit suhu 25℃ menggunakan sonikator kemudian disaring dengan kertas saring dan bantuan corong kaca dan vakum hingga diperoleh filtrat (2). Hasil filtrat 1 dan 2 diuapkan menggunakan kompor listrik pada suhu 50℃ selama 1 hari untuk menghilangkan pelarut dari campuran ekstrak (Fiana *et al*,. 2020). Hasil ekstrak ditimbang dengan cawan porselin yang sudah ditimbang, dihitung nilai rendemennya. Ekstrak dihitung nilai randemen dengan menggunakan persamaan 2.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

$$\%\text{Rendemen} = \frac{Bobot\ ekstrak\ (akhir)}{Bobot\ simplisia\ (awal)} \times 100\% \quad \text{.....(2)}$$

c. Skrining fitokimia

1) Fenolik

100 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Diambil 1 mL sampel ditambahkan dengan tiga tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Apabila terbentuk warna ungu kehitaman menunjukan hasil positif adanya fenolik (Qomaliyah *et al*., 2023).

2) Saponin

100 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Diambil 1 mL sampel diletakan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan aquadest 5 mL dan digoyang selama 1 menit. Jika terbentuk buih, ditambahkan 4 tetes larutan HCl 1 M. Jika tidak ada buih, dilanjutkan pemanasan 2-3 menit. Dibiarkan dingin lalu di kocok kuat. Terbentuknya buih stabil dalam waktu 8-10 menit menandakan terdapat senyawa saponin dalam sampel (F. D. Oktavia & Sutoyo, 2021).

3) Tanin

100 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Diambil 1 mL sampel ditambahkan 3 tetes $FeCl_3$ 1%. Hasil positif dapat dilihat berdasarkan terbentuknya warna pada sampel yaitu biru tua dan hitam kehijauan (Oktavia & Sutoyo, 2021).

4) Alkaloid

100 mg sampel dilarutkan dengan 10 mL metanol dan 15 mL amonia pada ph 8-9 kemudian hasil pencampuran tersebut disaring. Selanjutnya 2 mL larutan HCl 2M ditambahkan pada filtrat dan dikocok. Hasil yang didapatkan dimasukkan dalam 4 tabung reaksi masing-masing 5 tetes. Tabung 1 berisi larutan blanko, sedangkan tabung 2, 3, dan 4 akan dicampur dengan 1 tetes pereaksi Mayer, Wagner, Dragendorff pada setiap tabung (Oktavia & Sutoyo, 2021). Pada penambahan perekasi Mayer, positif mengandung alkaloid jika endapan putih atau kuning. Pada penambahan pereaksi Wagner, positif mengandung alkaloid jika

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

terbentuk endapan coklat. Pada penambahan Dragendrof, mengandung alkaloid jika terbentuk endapan jingga. Hasil positif alkaloid pada pengujian sekurang kurangnya terdapat dua reagen yang positif.

5) Flavonoid

100 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Diambil 1 mL sampel ditambahkan serbuk Mg 1 mg dan di teteskan 5 HCl pekat. Bila warna merah maka positif mengandung flavonoid (Oktavia *et al*., 2020).

6) Terpenoid

100 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Diambil 1 mL sampel ditambahan dengan pereaksi Bouchardat. Terbentuknya warna jingga kecoklatan menunjukan adanya terpenoid (Sulasmi *et al*., 2018)

4. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Pembuatan larutan $AlCl_3$ 10%

Ditimbang serbuk $AlCl_3$ dimasukan ke dalam *beaker glass* sebanyak 5 g setelah itu dilarutkan dengan aquadest sebagian hingga larut sempurna. Dimasukan ke dalam labu ukur 50 mL dan tambahkan aquadest sampai tanda batas (Robbiyan *et al*., 2021)

b. Pembuatan CH_3CO_2K

Diambil 981,4 mg CH_3CO_2K lalu dilarutkan dengan sebagian aquadest hingga larut sempurna di *beaker glass*. Kemudian dimasukan dalam labu ukur 10 mL ditambahkan aquadest hingga batas garis (Robbiyan *et al*., 2021)

c. Pembuatan larutan blanko

Diambil $AlCl_3$ 10% sebanyak 100µL menggunakan mikropipet ditambahkan 100µL CH_3CO_2K, aquadest 2,8 mL kedalam labu ukur 5mL dan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas (Robbiyan *et al*., 2021)

d. Pembuatan larutan standar kuersetin

Ditimbang 10 mg standar kuersetin yang akan dilarutkan dengan etanol p.a sampai volume 100 mL dan didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm (Candra *et al*., 2021).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

e. Penentuan panjang gelombang maksimal kuersetin

500 µL larutan kuersetin 60 ppm diambil kemudian direaksikan dengan 500 µL etanol p.a, 100 µL CH_3CO_2K, 100 µL $AlCl_3$ 10%, 2,8 mL aquades, dibaca dengan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 200-700 nm (Robbiyan *et al*., 2021). Panjang gelombang yang didapat 455 nm.

f. Penetapan *operating time* (OT) kuersetin

Diambil larutan kuersetin 60 ppm sebanyak 500 µL kemudian 500 µL etanol p.a, 100 µL CH_3CO_2K, 100 µL $AlCl_3$ 10% dan 2,8 mLaquades. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal dengan spektrofotometri UV-Vis, absorbansi panjang gelombang dicatat setiap 1 menit selama 60 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Robbiyan *et al*., 2021). *Operating time* yang diperoleh adalah 22 menit.

g. Pembuatan kurva baku kuersetin

Kurva baku kuersetin dibuat dengan menggunakan kuersetin seri konsentrasi 40, 50, 60, 70 , 80 dan 90 ppm. Seri konsentrasi dibuat dari larutan induk 100 ppm diambil sebanyak 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL dan 9 mL kemudian di tambahkan etanol p.a sampai tanda batas 10 mL. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 500 µL larutan seri kadar, lalu direaksikan 500 µL etanol p.a, 100 µL Kalium asetat 100 µL $AlCl_3$ 10% dan aquades sebanyak 2,8 mL kedalam larutan (Candra *et al*., 2021). Kemudian didiamkan selama *operating time* yaitu 22 menit. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 433 nm (Robbiyan *et al*., 2021).

h. Pembuatan larutan uji

Ditimbang 10 mg ekstrak daun jeruk nipis hasil maserasi dan UAE, kemudian larutkan pada etanol p.a sampai volume 10 mL untuk UAE, dan 5 mL untuk maserasi hingga di peroleh konsentrasi 1000 ppm dan 2000 ppm.

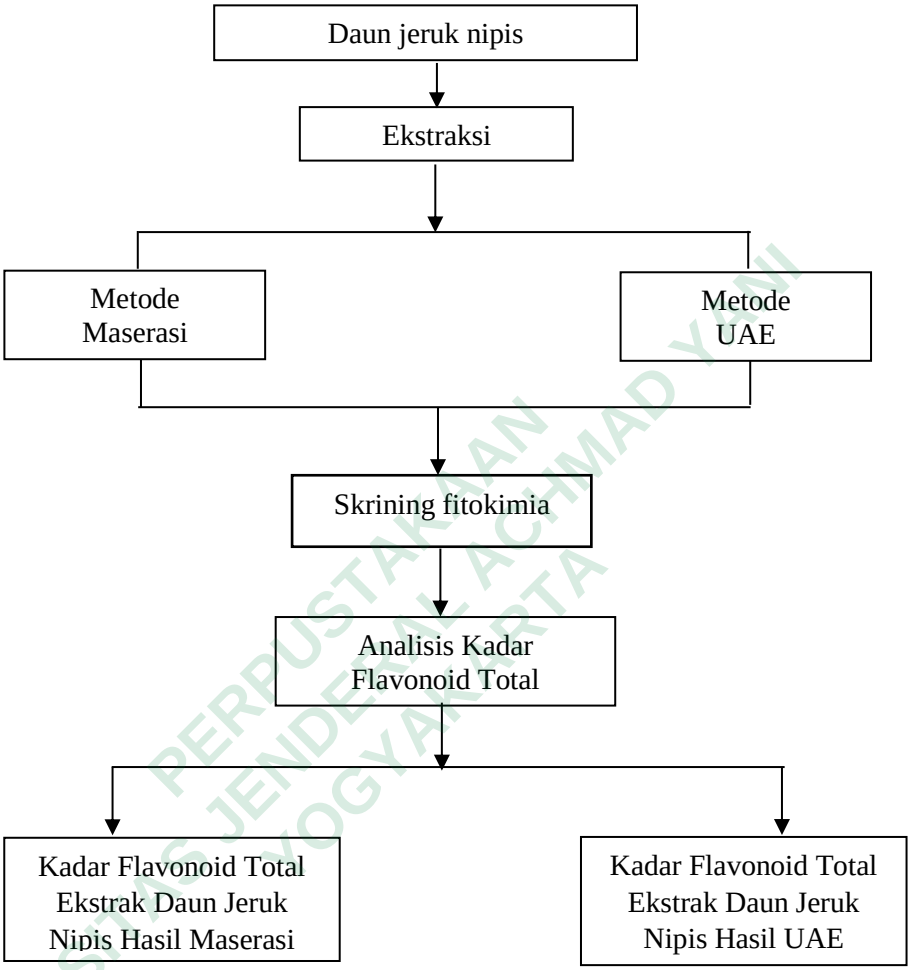
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

i. Penetapan kadar flavonoid total

Ekstrak etanol daun jeruk nipis hasil maserasi dan UAE 1000 ppm diambil sebanyak 500 µL dilarutkan 500µL etanol p.a, 100 µL kalium asetat, 100 µL $AlCl_3$ 10%, dan 2,8mL aquadest, didiamkan sampel selama *operating time* yaitu 22 menit. Absorbansi dibaca dengan spektrofotomteri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal 433nm. Dilakukan tiga kali replikasi (Putri *et al*., 2022).

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

j. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 10. Pelaksanaan Penelitian

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

H. Metode Pengolahan dan Analisa Data

1. Penentuan Kadar Flavonoid

Kaadar flavonoid total diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Hasilnya berupa nilai absorbansi yang dapat diperoleh dengan memasukannya ke dalam persamaan regresi linier y = bx + a, diperoleh dari kurva baku dan nilai absorbansi kuersetin. Nilai x berupa konsentrasi sampel baku sementara nilai y berupa nilai absorbansi sampel yang diukur dari spektrofotometri UV-Vis. Kadar flavonoid total ditentukan dengan rumus pada persamaan 3

$$TCF = \frac{C \,.\, V \,.\, fp}{g} \quad \text{.....(3)}$$

Keterangan:

TFC = Total flavonoid *content* (mg QE/gram)

C = Konsentrasi flavonoid (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)

Fp = Faktor pengenceran

G = Berat sampel yang digunakan (g)

2. Analisis Statistika

Analisis kadar flavonoid total ekstrak daun jeruk nipis hasil maserasi dan UAE menggunakan *Software Statistical Package for Social* (SPSS). Uji homogenitas menggunakan uji *Levenes* dengan hasil signifikan yaitu >0,05 dan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* dengan hasil signifikan >0,05. Data homogen dan data terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji -T *independent* dengan hasil nilai (2-tailed) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil menunjukkan data homogen dan terditribusi normal. Analisis dilanjutkan dengan uji T – Independent dengan hasil <0,05 yang berarrti terdapat perbedaan yang signifikan.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN