

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini tergolong bentuk penelitian kuantitatif dan kualitatif yang memakai metode eksperimental. Uji kualitatif pada penelitian ini ialah skrining fitokimia ekstrak etanol 96% dan fraksi daun jeruk nipis, sedangkan uji kuantitatif melibatkan uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat dan membandingkan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak etanol 96% serta fraksi etil asetat daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta Pada bulan Juni - Juli 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi: Daun jeruk nipis diambil dari kebun warga di daerah Sumber Batikan, RT.04, Trirenggo. Kec. Bantul, Kab. Bantul, Derah Istimewa Yogyakarta.
2. Sampel: Sampel daun jeruk nipis dikumpulkan dengan memilih daun yang memiliki kondisi tidak terlalu muda ataupun tua yaitu daun yang berwarna hijau, bukan hijau kekuningan ataupun hijau tua, masih segar dan dipetik di pagi hari.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Penelitian ini variabel bebasnya yaitu pelarut yang digunakan pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis.

2. Variabel Terikat

Variabel yang diukur dalam penelitian ini, yaitu aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat yang dibuktikan dengan nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration*).

3. Variabel Terkendali

Variabel yang diukur dalam penelitian ini, yaitu tempat tumbuh, usia tanaman, waktu panen, waktu dan suhu pengeringan, waktu dan suhu ekstraksi, pelarut ekstrak dan fraksi.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak etanol daun jeruk nipis didapatkan melalui proses UAE menggunakan pelarut 96%. Simplisia daun jeruk nipis diperoleh dari kebun warga di daerah Sumber Batikan, RT.04, Trirenggo, Kec. Bantul, Kab. Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta.
2. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis senyawa metabolit sekunder yang ada didalam sampel. pada penelitian ini, dilakukan uji terhadap uji flavonoid, uji alkaloid, uji tanin, uji fenolik, dan uji saponin.
3. Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Hasil nilai absorbansi ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis yang kemudian dihitung persen peredaman dan ditentukan IC_{50} nya. IC_{50} merupakan konsentrasi yang diperlukan sampel dalam mencegah suatu radikal bebas DPPH sebesar 50%, ditandai dengan semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan tingkat aktivitas peredaman radikal bebas yang lebih tinggi.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Ayakan 40 mesh, cawan porselin, corong kaca, gelas ukur (*Iwaki*), grinder simplisia (*Fomac*), kaca arloji, kompor listrik, labu ukur (*Iwaki*), mikropipet, pengaduk, penangas air, pipet tetes, rak tabung, sendok tanduk, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer*), timbangan analitik (*Ohaus SW version 10S*), tabung reaksi (*Iwaki*), labu erlenmeyer (*Iwaki*), wajan.

2. Bahan Penelitian

Asam sulfat (H_2SO_4), aluminium foil, AlCl_3 1%, amoniak, aquadest, daun jeruk nipis, DPPH (Merck® HIMEDIA), etanol p.a (Merck® Jerman), etanol 96% (teknis), etil asetat (Merck® Jerman), FeCl_3 1% (Merck® Jerman), kertas saring, kloroform p.a (Merck® Jerman), n-heksan p.a (Merck® Jerman), Pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff, standar kuersetin (SIGMA Aldrich).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan Sampel dan Determinasi Tanaman

Daun jeruk nipis dipanen sebanyak 2 kg dari kebun warga di daerah Sumber Batikan dengan usia tanaman sekitar 3-5 tahun. Daun yang digunakan tidak begitu muda ataupun tua yaitu daun yang berwarna hijau, bukan hijau kekuningan ataupun hijau tua, tidak dalam keadaan kering dan terbebas dari jamur dengan melihat pada bagian depan dan belakang daun tidak ada jamur yang berwarna hitam ataupun putih. Daun jeruk nipis terlebih dahulu dilakukan determinasi dengan mengirimkan foto bagian tanaman yang terdiri dari batang jeruk nipis, daun jeruk nipis dan buah jeruk nipis. Determinasi dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Penyiapan Sampel

Daun jeruk nipis yang telah dipanen selanjutnya disortasi basah untuk membersihkan kotoran ataupun benda asing yang terdapat di daun. Setelah itu dicuci menggunakan air mengalir untuk melepaskan bahan pengotor lain yang masih tersisa. Daun dikeringkan dengan cara dimasukan kedalam oven menggunakan suhu 50°C yang ditandai dengan saat daun dipegang mudah hancur (Aulia, 2023). Daun jeruk nipis yang telah kering, selanjutnya diserbuk menggunakan alat penggiling (grinder) untuk mengecilkan ukuran partikel kemudian serbuk yang sudah dihaluskan tersebut diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 40 mesh agar ukuran partikelnya seragam (Yanuary, 2021). Serbuk yang telah halus, dimasukan dan disimpan di dalam wadah toples kaca yang ditutup rapat agar tidak terkena kotoran luar seperti debu yang dapat merusak kualitas senyawa aktif yang terkandung didalam sampel.

3. Ekstraksi Daun Jeruk Nipis

Ekstrak daun jeruk nipis diperoleh memakai metode UAE. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% dengan perbandingan antara pelarut dan simplisia 1:10. Timbang sebanyak 50 gram dengan empat kali pengulangan sehingga jumlah keseluruhan sebanyak 200 gram, masukan kedalam empat erlenmeyer masing-masing berisi 50 gram sampel dan 500 mL etanol 96%, sampel diekstraksi menggunakan sonikator dan diekstraksi selama 20 menit pada suhu 20°C-40°C. Setelah diekstraksi kemudian disaring untuk memisahkan filtrat dengan ampasnya. Ampas tersebut lalu diekstraksi kembali sebanyak satu kali menggunakan pelarut etanol 96% dengan jumlah yang sama. Sampel disaring dengan memakai kertas saring yang dibantu dengan corong kaca untuk memisahkan ampas dan larutannya. Larutan yang sudah didapat, selanjutnya dipekatkan menggunakan kompor listrik dengan suhu 50°C untuk menjaga kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam sampel, karena senyawa flavonoid stabil sampai pada suhu 85°C (Gultom, 2020), dipekatkan sampai didapat ekstrak kental dari daun jeruk nipis. Ekstrak kental yang didapat di timbang dan dihitung nilai rendemennya menggunakan rumus dibawah ini:

$$\text{Jumlah Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat simplisia (g)}} \times 100\%$$

4. Uji Kadar Air Ekstrak Etanol 96% Daun Jeruk Nipis

Pengujian kadar air menggunakan alat *Moisturize Balance*. Ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dimasukan kedalam alat *Moisturize Balance*, tunggu sampai alat menunjukkan hasil kadar air dengan satuan persen (%). Parameternya ketika alat menunjukkan indikator warna hijau yang menandakan bahwa kadar akhir sudah stabil. Suhu yang digunakan yaitu 105°C (Luthfiani, 2018). Kadar air dalam ekstrak harus $\leq 10\%$ yang bertujuan untuk mencegah pertumbuhan jamur secara cepat di dalam ekstrak (Wandira, 2023)

5. Fraksinasi Ekstrak Etanol 96% Daun Jeruk Nipis

Fraksinasi menggunakan corong pisah dengan perbandingan 1:5 antara sampel dengan pelarut. Timbang sejumlah 20 g ekstrak etanol daun jeruk nipis dan dimasukkan kedalam gelas beaker lalu dilarutkan dengan 100 mL aquadest hangat untuk mempercepat proses pelarutan. Setelah dingin dituangkan ke corong pisah, lalu dimasukkan 100 mL pelarut n-heksan, corong ditutup dan digoyangkan kuat agar menjadi dua fase larutan yang tercampur, sambil sesekali kran corong dibuka untuk mengeluarkan gas yang terdapat dalam corong sampai habis. corong didiamkan selama 30 menit untuk membentuk dua fase yang berbeda dimana lapisan n-heksan berada dibagian atas, setelah membentuk batas pemisahan yang jelas kemudian fase n-heksan diambil dan dimasukkan kedalam erlenmeyer. Ulangi sebanyak tiga kali, dengan jumlah pelarut yang sama. Hasil fase n-heksan yang sudah ditampung kemudian dipekatkan dengan penangas air dengan suhu 40°C. Fraksi yang tidak larut dengan n-heksan, kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat 100 mL kemudian digojog sampai membentuk 2 fase yang berbeda dimana lapisan etil asetat berada dibagian atas, diulangi sebanyak tiga kali. Fraksi etil asetat yang sudah didapat kemudian dijadikan satu lalu dipekatkan menggunakan penangas air dengan suhu 40°C. Fraksi yang tidak larut dengan etil asetat merupakan fraksi air, hasil fraksinasi dikumpulkan dan diuapkan menggunakan penangas air dengan suhu 40°C. Ketiga fraksi yang diperoleh lalu ditimbang bobotnya dan dihitung nilai rendemennya dengan rumus:

$$\text{Jumlah Rendemen} = \frac{\text{Bobot fraksi}(g)}{\text{Bobot ekstrak}(g)} \times 100\%$$

Hasil fraksi etil asetat kemudian dilakukan uji kadar air, skrining fitokimia dan uji peredaman radikal bebas DPPH.

6. Skrining Fitokimia

a. Uji flavonoid

Masukan sejumlah ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis masing-masing 20 mg kedalam tabung reaksi, dan encerkan menggunakan etanol p.a sebanyak 2 mL selanjutnya tambahkan AlCl_3 1%

5 mL. Apabila menunjukkan warna kuning artinya sampel tersebut positif flavonoid (Marpaung, 2018).

b. Uji Fenolik

Ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis ditimbang sejumlah 20 mg, kemudian larutkan menggunakan etanol p.a 2 mL lalu tetesi dengan FeCl_3 1% sebanyak 3 tetes. Positif mengandung senyawa fenol jika warna yang dihasilkan hitam kebiruan atau hitam pekat (Salsabila, 2022).

c. Uji Saponin

Ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis ditimbang seberat 20 mg masukan kedalam tabung reaksi lalu tambahkan 2 mL aquadest panas dan dikocok kuat selama 10 detik hingga homogen. Hasil positif ditunjukkan, jika adanya busa stabil setinggi 1-10 cm lebih dari 10 menit dan busa tidak hilang jika ditetesi HCl 2 N (Andasari, 2020).

d. Uji Tanin

Setiap sampel seberat 20 mg ditambahkan 2 mL etanol p.a lalu di tetesi dengan FeCl_3 1% 2 tetes. Hasil positif ditunjukkan oleh timbulnya warna hijau kehitaman atau biru kehitaman (Salsabila, 2022).

e. Uji Alkaloid

Ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis masing-masing seberat 30 mg dilarutkan menggunakan kloroform secukupnya. Larutan tersebut ditambahkan amoniak dan kloroform masing-masing sebanyak 10 mL lalu tetesi H_2SO_4 10 tetes, lalu di kocok hingga homogen dan ditunggu hingga dua lapisan. Lapisan atas diambil 1 mL dan dimasukan kedalam 3 tabung reaksi. Setiap tabung ditambahkan 1 mL pereaksi Wagner, Mayer dan Dragendorff. Positif mengandung alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna putih (Mayer), endapan berwarna kuning (Wagner), dan endapan berwarna jingga (Dragendorff). Dikatakan adanya senyawa alkaloid apabila dua dari tiga pereaksi tersebut menunjukkan hasil positif (Subaryanti, 2022).

7. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH

Timbang seberat 3,94232 mg serbuk DPPH 0,1 mM, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL, yang sudah dilapisi menggunakan aluminium foil agar terlindung dari cahaya, lalu tambahkan etanol p.a sampai garis batas (Yanuary, 2021).

b. Pembuatan pembanding

Timbang seberat 10 mg kuersetin, dimasukkan ke labu ukur 100 mL lalu tambahkan etanol p.a hingga mencapai tanda garis dan digojog sampai tercampur, sehingga didapatkan larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan dibuat seri konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm dengan memipet sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL dan 2,5 mL dari larutan induk, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda garis (Aulia, 2023).

c. Penentuan panjang gelombang maksimal DPPH

Cairan DPPH diambil sejumlah 2 mL dan diukur panjang gelombangnya menggunakan spektrofotometri UV-Vis di rentang 400 sampai 800 nm (Susiloningrum, 2021). Hasil penentuan panjang gelombang maksimal DPPH yaitu 517 nm.

d. Penentuan *operating time*

Operating time dilakukan untuk menentukan waktu pengukuran absorbansi yang diperlukan senyawa uji untuk bereaksi dengan senyawa DPPH (Basuki, 2021), ditunjukkan dengan adanya perubahan warna yang terjadi dari ungu menjadi kuning. Penentuan *operating time*, didasarkan pada saat nilai absorbansi larutan uji terhadap DPPH mulai mencapai kestabilan (Putri, 2023). Penentuan ini menggunakan perbandingan 1:2 dengan mengambil larutan standar kuersetin dari konsentrasi 15 ppm sebanyak 1 mL dan larutan induk DPPH sebanyak 2 mL. Selanjutnya, campuran di aduk sampai homogen dengan bantuan vortex, lalu serapannya diukur setiap 1 menit sekali selama 60 menit (Anggraini *et al.*, 2018) pada spektrofotometer UV-Vis di panjang gelombang maksimal yaitu 517 nm.

Waktu yang menghasilkan absorbansi paling stabil dianggap sebagai *operating time*. Hasil pengukuran *operating time* diperoleh waktu yang stabil pada menit ke-30 menit.

e. Pembuatan larutan sampel uji

Ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis diambil seberat 10 mg, kemudian dicairkan menggunakan etanol p.a dan dimasukkan ke labu ukur 10 mL sampai mencapai garis batas, sehingga didapat konsentrasi 1000 ppm. Setiap sampel diambil 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL lalu masukan kedalam labu ukur 10 mL (sehingga di dapatkan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm) lalu tambahkan etanol p.a sampai mencapai tanda batas (Aulia, 2023).

f. Penetapan aktivitas antioksidan

Ambil sebanyak 1 mL dari larutan ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis serta standar kuarsetin dari berbagai konsentrasi yang sudah ada, lalu mencampurkannya dengan 2 mL larutan DPPH. Campuran di inkubasi pada suhu kamar sesuai dengan waktu *operating time* yang sudah diperoleh yaitu 30 menit, kemudian serapannya di ukur dengan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimal 517 nm serta dibuat tiga kali replikasi pada masing-masing sampel.

H. Metode Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Perhitungan nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Parameter yang dipakai dalam mendefinisikan hasil dari uji peredaman radikal bebas DPPH yaitu nilai IC₅₀, yang merupakan konsentrasi yang menghasilkan penurunan aktifitas DPPH sebesar 50%. Perhitungan IC₅₀, diperlukan data persentase inhibisi yang bisa dihitung memakai rumus:

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

Keterangan:

Abs. Blanko = Nilai absorbansi DPPH sebelum direaksikan dengan sampel uji pada panjang gelombang maksimal.

Abs. Sampel = Nilai absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan larutan sampel uji dan pembanding.

Nilai IC_{50} dapat diperhitungkan menggunakan rumus regresi linear. Dimana konsentrasi sampel dikaitkan dengan sumbu (x) dan persentase inhibisi sebagai sumbu (y) dengan persamaan:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

y = nilai absorbansi

x = nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} dapat diperoleh dari nilai x setelah mengganti nilai y dengan 50 atau dengan memakai rumus ($IC_{50} = \frac{50-a}{b}$), nilai IC_{50} yang semakin kecil menandakan bahwa aktivitas antioksidannya semakin tinggi.

2. Pengolahan data hasil penelitian

Data nilai IC_{50} dari ekstrak dan fraksi yang di hasilkan dianalisis dengan aplikasi *Statistical Product and Service Solution* (SPSS). Uji normalitas dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena data yang dihasilkan pada penelitian ini <50 (Agustin, 2020), dan uji homogenitas menggunakan *Levene Statistic* dengan taraf kepercayaan 95% atau nilai *sig value* nya >0,05. Data yang terdistribusi normal dan homogen selanjutnya diuji *One Away ANOVA* untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdapat perbedaan, dengan taraf kepercayaan jika nilai *sig value* nya <0,05. Untuk mengidentifikasi sampel yang berbeda secara signifikan, uji *Post Hoc Tetst*. Data yang tidak terdistribusi normal maupun homogen maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan *Man Whitney* dengan nilai *sig value* nya >0,05.