

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium dan bertujuan untuk menentukan pengaruh jenis pelarut ekstraksi terhadap kemampuan ekstrak daun jeruk nipis dalam mengaktifkan fungsi peredaman radikal bebas DPPH. Daun jeruk nipis diekstraksi menggunakan pelarut dengan berbagai tingkat kepolaran, yaitu etanol 96%, metanol, dan aseton. Metode ekstraksi yang dipakai yaitu *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Skirining fiokimia dengan uji tabung, dan identifikasi senyawa flavonoid menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) pada setiap ekstrak diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, dari bulan April hingga Juni 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi penelitian ini yaitu daun jeruk nipis diperoleh di Sumber Batikan, Tirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta.
2. Sampel yang akan digunakan penelitian ini yaitu daun jeruk nipis yang tidak terlalu muda dan tua, daun ketiga hingga kelima dari pucuk, tidak kering dan masih segar.

D. Variabel

1. Variabel bebas untuk penelitian ini adalah berupa ekstrak daun jeruk nipis yang diekstraksi dengan jenis pelarut yang berbeda.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dari ekstrak daun jeruk nipis berupa nilai IC_{50} .
3. Variabel terkontrol untuk penelitian ini adalah tempat tumbuh, waktu panen, suhu pengeringan, waktu dan suhu ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak merupakan hasil yang diperoleh dari proses ekstraksi senyawa aktif dari simplisia daun jeruk nipis dengan metode UAE menggunakan jenis pelarut yang sesuai.
2. Pelarut merupakan suatu zat yang memiliki kemampuan untuk melarut dengan zat lain untuk membentuk larutan. Jenis pelarut yang digunakan adalah etanol, metanol, dan aseton.
3. IC₅₀ didefinisikan sebagai konsentrasi efektif antioksidan yang diperlukan untuk menghambat konsentrasi DPPH awal sebesar 50% pada ekstrak daun jeruk nipis.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan 40 mesh, corong kaca, blender, kertas saring Whatman no.1, mikropipet (Eppendorf), oven, pipet tetes, rak tabung reaksi, sonikator (*Cole Parmer Waterbath Sonicator*), seperangkat alat gelas, spektrofotometer UV-Vis Genesys, timbangan analitik (Ohaus), waterbath (Mettler), vortex (Dlab mx-s).

2. Bahan

Aquades, asam format, asam asetat glasial (Merck), aseton (Mallinckrodt), aseton (Teknis), aluminium foil, daun jeruk nipis, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), etanol (Merck), etanol 96% (Teknis), etil asetat (Merck), FeCl₃ 1%, HCl pekat (Mallinckrodt), H₂SO₄ pekat (Mallinckrodt), kloroform (Merck), kuersetin (Sigma), magnesium (Merck), metanol (Merck), metanol (Teknis), NH₃ (Merck), n-butanol (Merck), reagen Dragendroff, reagen Mayer, reagen Wagner, silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), toluen (Mallinckrodt).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi

Daun jeruk nipis dideterminasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

Determinasi dilakukan untuk memastikan keaslian simplisia daun jeruk nipis yang akan digunakan.

2. Preparasi sampel

Daun jeruk nipis yang telah dipanen adalah daun ketiga hingga daun kelima dari pucuk selanjutnya dibersihkan dari kotoran melalui proses sortasi basah. Daun jeruk nipis dicuci dengan air, ditiris, dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 3 hari dan dilanjutkan dengan sortasi kering yaitu untuk menentukan atau memilih bagian simplisia kering yang akan digunakan untuk menghindari simplisia yang rusak karena pengeringan sebelumnya. Simplisia kering diserbuk haluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 40 mesh untuk mendapatkan partikel halus (Adelina *et al.*, 2017; Yanuarty, 2021).

3. Ekstraksi

Sebanyak 100 g serbuk daun jeruk nipis diekstraksi menggunakan metode UAE selama 30 menit pada suhu 40°C (Singanusong *et al.*, 2015), dengan perbandingan 1:10 (b/v) antara simplisia dan pelarut (Tutik *et al.*, 2018). Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96%, metanol dan aseton masing-masing 1000 mL. Masing-masing ekstrak disaring menggunakan kertas saring, dilakukan pengulangan ekstraksi dengan pelarut baru sebanyak 500 mL dan disaring. Filtrat yang didapat diuapkan menggunakan penangas air pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental (Tutik *et al.*, 2018). Masing-masing ekstrak kental yang diperoleh dihitung nilai rendemen dengan rumus pada persamaan (1).

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

4. Uji organoleptik

Uji organoleptik dengan mengamati bentuk, warna, bau, dan rasa pada masing-masing ekstrak yang diperoleh (Suryani *et al.*, 2023).

5. Uji skrining fitokimia

100 mg ekstrak daun jeruk nipis dilarutkan dalam 10 mL etanol kemudian dikocok agar tercampur rata (Katja, 2020).

a. Alkaloid

1 mL larutan ditempatkan dalam gelas *beaker*, diikuti larutan kloroform dan NH_3 pekat yang telah disaring sebanyak 10 mL, lalu 10 tetes H_2SO_4 pekat, dan dilakukan penggojokan hingga membentuk 2 lapisan, diambil lapisan atas masing-masing 1 mL (Arianta *et al.*, 2022). Dibagi dalam tiga tabung reaksi, pereaksi Dragendroff dimasukkan dalam tabung I, pereaksi Mayer dimasukkan ke tabung II, dan pereaksi Wagner dimasukkan ke tabung III sebanyak 1 tetes. Terdapat endapan berwarna jingga (I), putih atau kekuningan (II), dan jingga hingga coklat (III) positif adanya alkaloid (Katja, 2020). Sampel dikatakan mengandung alkaloid apabila minimal didapat endapan pada dua atau lebih pereaksi pengendapan yang dilakukan (Setiawan, 2013).

b. Fenolik

1 mL larutan ditempatkan dalam tabung reaksi, diikuti larutan FeCl_3 1% 2 tetes. Terjadinya perubahan menjadi warna biru tua atau hijau kehitaman menandakan bahwa sampel mengandung fenolik (Manongko *et al.*, 2020).

c. Flavonoid

1 mL larutan ditempatkan dalam tabung reaksi, diikuti etanol 4-5 tetes lalu dilakukan penggojokan. Dimasukkan 100 mg serbuk magnesium (Mg) dan HCl pekat 1-2 tetes. Warna merah, kuning, dan orange pada larutan menunjukkan positifnya kandungan flavonoid (Katja, 2020).

d. Tanin

1 mL larutan ditempatkan dalam tabung reaksi, diikuti larutan FeCl_3 1% 2-3 tetes. Terjadinya perubahan warna menjadi biru tua atau hijau kehitaman menandakan bahwa sampel mengandung tannin (Manongko *et al.*, 2020).

e. Saponin

1 mL larutan ditempatkan dalam tabung reaksi, diikuti 1 mL aquades dan dilakukan penggojokan. Larutan dipanaskan 2-3 menit. Setelah dingin, dilakukan penggojokan kembali hingga terbentuk buih atau busa menandakan hasil positif saponin (Katja, 2020).

6. Uji kromatografi lapis tipis

Metode uji kromatografi lapis tipis mengacu pada Putri *et al.*, (2023); Yuda *et al.*, (2017) sebelumnya telah dimodifikasi oleh penulis.

a. Pembuatan fase gerak dan penjenjuran

Membuat fase gerak yang terdiri dari etil asetat : metanol : aquades (1:4:5). Fase gerak dimasukkan kedalam bejana, kemudian kertas saring 18 cm yang telah disiapkan dimasukkan kedalam bejana, ditutup rapat, fase gerak akan membasahi kertas saring untuk melihat telah jenuh (Putri *et al.*, 2023).

b. Prosedur uji KLT

Ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis serta pembanding kuersetin diuji menggunakan metode KLT. Fase diam silika gel 60 F₂₅₄ disiapkan dengan ukuran 5x10 cm (lebar x tinggi), lalu dimasukkan kedalam oven untuk diaktifasi dengan suhu 100°C selama 30 menit. Fase diam diambil dan dibuat garis 1 cm sebagai batas atas dan bawah menggunakan pensil, beri jarak tanda tolotan sampel dan pembanding 1 cm untuk mempermudah penotolan. Standar kuersetin dan masing-masing ekstrak sebanyak 10 mg/mL metanol kemudian ditotolkan pada tanda batas bawah fase diam, kemudian dimasukkan kedalam bejana dan dielusi sampai tanda pada bagian atas (Yuda *et al.*, 2017). Plat KLT yang telah dielusi dikering anginkan dan dilihat dibawah sinar UV panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Hasil positif terbentuknya bercak berwarna kuning (Putri *et al.*, 2023). Nilai R_f dihitung dengan rumus pada persamaan (2).

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh analit}}{\text{Jarak tempuh pelarut}} \dots \dots \dots (2)$$

7. Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH daun jeruk nipis

Pengujian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH oleh peneliti Maravirnadita, (2019); Yanuarty, (2021) sebelumnya telah dimodifikasi oleh penulis.

a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

3,9 mg serbuk DPPH dengan berat molekul 394,323 dilarutkan dalam metanol p.a, larutan ini kemudian dimasukkan dalam labu takar hingga mencapai batas volume 100 mL.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum

1 mL metanol dicampurkan ke dalam larutan DPPH 0,1 mM 2 mL, selanjutnya serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 400-800 nm, dan didapatkan panjang gelombang 516 nm.

c. Penentuan *operating time*

1 mL kuersetin dari konsentrasi 10 ppm dicampur dengan larutan DPPH 0,1 mM 2 mL, selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan nilai absorbansi pada panjang gelombang absorbansi maksimum yang telah didapatkan. Interval absorbansi setiap 1 menit selama 1 jam, dan didapatkan *operating time* selama 44 menit.

d. Pembuatan larutan blanko

1 mL metanol dicampurkan ke dalam DPPH 0,1 mM 2 mL, lalu disimpan di tempat gelap sesuai *operating time* yaitu selama 44 menit. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yaitu 516 nm.

e. Pembuatan larutan kuersetin (100 ppm)

10 mg kuersetin dilarutkan dalam 100 mL metanol. Pengenceran pada konsentrasi larutan 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dalam 5 mL metanol.

f. Pembuatan larutan sampel (1000 ppm)

100 mg ekstrak sampel dilarutkan dalam 100 mL metanol, diencerkan larutan dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm dalam 5 mL metanol.

g. Penetapan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Larutan sampel dan kuersetin dengan berbagai konsentrasi diambil 1 mL dicampurkan dengan larutan DPPH 0,1 mM dalam tabung reaksi sebanyak

2 mL. Larutan diinkubasi dalam tempat gelap selama *operating time* yaitu selama 44 menit, dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal 516 nm. Sebagai blanko menggunakan metanol 2 mL.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan nilai IC₅₀

Absorbansi yang diperoleh dihitung nilai %inhibisi dilakukan dengan rumus pada persamaan (3).

$$\%inhibisi = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

Hasil data yang diperoleh dibuat persamaan regresi linear $y = bx + a$ nilai y diubah menjadi 50, nilai x adalah hasil yang menunjukkan nilai IC₅₀. Kategori nilai IC₅₀ dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Sifat Antioksidan Berdasarkan Nilai IC₅₀ (Anggriani & Anggarani, 2022)

Sifat Antioksidan	Nilai IC ₅₀ (ppm)
Sangat kuat	<50
Kuat	50-100
Sedang	100-150
Lemah	150-200

2. Analisis data

Data dianalisis dengan menggunakan *Statistical Program for Social Science* (SPSS). Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro Wilk dan uji homogenitas menggunakan uji Levene. Apabila data terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* taraf kepercayaan 95%. Apabila data tidak terdistribusi normal dan homogen dilakukan uji Kruskal Wallis dan Mann Whitney dengan taraf kepercayaan 95%.