

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Studi ini menerapkan desain eksperimental melalui metode analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif meliputi skrining fitokimia (uji senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenolik, terpenoid) sedangkan kuantitatif meliputi penentuan reaksi yang ditimbulkan peredaman radikal bebas ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle) dalam menghambat senyawa radikal DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*), kemampuan antioksidan untuk menetralkan radikal bebas daun jeruk nipis dinyatakan dengan nilai IC<sub>50</sub>

#### **B. Lokasi dan Waktu**

##### 1. Lokasi

Studi ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi, Program Studi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

##### 2. Waktu

Studi ini berlangsung pada periode Juni hingga Agustus 2025.

#### **C. Populasi/Sampel/Objek Penelitian**

##### 1. Populasi

Daun jeruk nipis dalam studi ini dikumpulkan dari pekarangan rumah penduduk yang berlokasi di Sumber Batikan, Trirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Titik koordinat lokasi pengambilan sampel adalah -7.909040, 110.342826.

##### 2. Sampel

Daun yang digunakan adalah yang dipetik pada pagi hari antara pukul 08.00-10.15 WIB dengan kriteria daun berwarna hijau tua, daunnya masih lengkap, tidak berlubang atau mengalami kerusakan,

terletak pada urutan keempat hingga ketujuh di setiap ranting dari pucuk (Pratiwi, 2021).

#### **D. Variabel Penelitian.**

1. variabel bebas pada kajian ini merupakan ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis.
2. Variabel dependen pada penelitian ini berfokus pada penentuan nilai  $IC_{50}$ .
3. Variabel terkendali pada kajian ini adalah lokasi pertumbuhan, periode panen, ciri-ciri daun, temperatur serta durasi pengeringan, jenis pelarut yang digunakan, teknik ekstraksi, temperatur dan durasi ekstraksi, serta temperatur proses pengentalan ekstrak. .

#### **E. Definisi Operasional Variabel**

1. Ekstrak etanol daun jeruk nipis diperoleh melalui proses ekstraksi Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) dengan memanfaatkan pelarut etanol 96%.
2. Prinsip kerja metode ini berdasarkan gelombang ultrasonik yang menyebar melalui suatu media cair, akan menimbulkan getaran yang memicu pengadukan secara intensif selama tahapan ekstraksi. Mekanisme ini meningkatkan kecepatan proses perpindahan zat terlarut dan pelarut melalui membran semipermeabel, sehingga mengoptimalkan efektivitas proses ekstraksi (Setyantoro *et al.*, 2019).
3. Kemampuan ekstrak etanol daun jeruk nipis dalam menetralkan radikal bebas DPPH dievaluasi menggunakan nilai  $IC_{50}$  (*inhibition concentration*).
4. Nilai  $IC_{50}$  sendiri merupakan konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menangkal 50% radikal bebas.

#### **F. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Ayakan mesh 40, cawan porselen, alat penggiling (*Fomac*), pemanas listrik, labu ukur, mikropipet (*Ohaus*), *moisture analyzer*, pipet ukur, perangkat sonikasi (*GT-Sonic*), spektrofotometer UV-Vis

(*Thermo Scientific Genesys 10S*), timbangan analitik (*Ohaus PAJ1003*), tabung reaksi, serta berbagai peralatan gelas lainnya (*Pyrex*).

## 2. Bahan

Penelitian ini menggunakan berbagai bahan, antara lain daun jeruk nipis, akuades (p.a), *blue tip*, larutan DPPH (*Sigma Aldrich*), etanol 96% (teknis), asam klorida pekat (*Merck*), HCl 1M p.a (*Merck*), kain mori, kertas saring, kuersetin (*sigma aldrich*), metanol pro analysis (*Merck*), reagen FeCl<sub>3</sub> 1% (teknis), reagen dragendroff ( grade teknis), reagen Mayer (grade teknis), reagen Wagner (grade teknis), serbuk magnesium pro analisis (*Merck*), reagen bouchardat (teknis).

## G. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Daun jeruk nipis dipetik dari pekarangan warga yang berlokasi di Sumber Batikan, Tirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta. Setelah itu, dilakukan determinasi tanaman di Fasilitas riset Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan.

### 2. Pengumpulan sampel

Daun jeruk nipis yang digunakan adalah yang dipetik sebanyak 2,220 Kg pada pagi hari jam 08.00-10.15 WIB daun yang digunakan memiliki karakteristik berwarna hijau tua dengan kondisi fisik yang utuh, tanpa adanya kerusakan maupun lubang. Pengambilan sampel dari daun keempat hingga ketujuh dari setiap ranting yang dihitung mulai dari bagian pucuk tanaman (Pratiwi, 2021). Proses berikutnya sortasi basah, yaitu pembersihan daun jeruk nipis dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaan daun. Sampel terlebih dahulu dikering-anginkan, kemudian dilanjutkan dengan penggunaan oven pada temperatur 50°C selama 3 hari hingga mudah hancur ketika diremas, kemudian dihaluskan menggunakan penggiling dan disaring memakai saringan 40 mesh (Sari *et al.*, 2024).

### 3. Pembuatan ekstrak etanol daun jeruk nipis

Sebanyak 100 gram bubuk simplisia daun jeruk nipis diekstraksi menggunakan 1000 mL etanol 96% dengan rasio 1:10 (b/v), yang dibagi ke dalam dua erlenmeyer masing-masing berisi 50 gram simplisia dan 500 mL pelarut. Proses ekstraksi menggunakan bantuan sonikator selama 60 menit pada temperatur 25°C. Setelah proses tersebut, larutan hasil ekstraksi disaring terlebih dahulu dengan kain mori, kemudian menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat pertama (1). Ampas yang tersisa dari penyaringan awal digabungkan dan diekstraksi ulang memanfaatkan 500 mL etanol 96% dengan waktu proses 60 menit pada temperatur yang sama menggunakan sonikator. Hasil ekstraksi kedua juga disaring menggunakan kain mori dan kertas saring hingga diperoleh filtrat kedua (2). Prosedur ini dilakukan dalam tiga batch. Seluruh filtrat yang diperoleh kemudian digabung dan diuapkan menggunakan penangas air dengan temperatur 50°C, dan rendemen ekstrak dihitung berdasarkan persamaan (1) (Sari *et al.*, 2024).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental}}{\text{Berat Serbuk}} \times 100\% \dots (1)$$

### 4. Uji kadar kelembapan

Penentuan kadar kelembapan dilakukan dengan menggunakan moisture analyzer. ekstrak daun jeruk nipis yang diperoleh dengan proses ekstraksi ditakar dengan bobot 0,5 g dalam cawan *moisture analyzer* dan disesuaikan pada temperatur 105°C. Proses pemanasan berlangsung sampai alat memberikan sinyal, menandakan bahwa pengukuran telah selesai, dan kadar kelembapan bisa segera terbaca di panel. Data hasil pengukuran kadar kelembapan tersebut selanjutnya ditulis (Cahyaningrum *et al.*, 2024).

### 5. Uji organoleptik

Pengujian organoleptik untuk mengetahui sifat fisik sampel yang meliputi warna, aroma dan tekstur ekstrak (Andika *et al.*, 2021).

## 6. Uji penapisan fitokimia

Pada analisis penapisan fitokimia ini, pengujian menggunakan ekstrak etanol daun jeruk nipis yang diperoleh melalui metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Jenis uji fitokimia yang digunakan meliputi identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenolik, serta terpenoid.

### a. Alkaloid

Sebanyak 100 miligram sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a, kemudian ditambahkan 15 mL amonia, dan campuran tersebut disaring untuk memperoleh filtrat. Selanjutnya, Sebanyak 2 mL larutan HCl 2M dicampurkan ke dalam filtrat kemudian digojog hingga homogen. Larutan tersebut kemudian dipisahkan ke dalam empat tabung reaksi, tiap tabung berisi lima tetes. Tabung pertama digunakan sebagai kontrol (blanko), sementara pada ke-2, ke-3, dan ke-4 masing-masing ditambahkan satu tetes pereaksi Mayer dan Wagner, serta Dragendorff. Reaksi positif terhadap alkaloid ditandai dengan munculnya endapan berwarna putih atau kekuningan pada pereaksi Mayer, serta endapan berwarna coklat pada pereaksi Wagner, serta endapan jingga pada pereaksi Dragendorff. Suatu sampel dinyatakan positif mengandung alkaloid apabila setidaknya dua dari tiga pereaksi memberikan hasil positif (Sari *et al.*, 2024).

### b. Flavonoid

Sampel seberat 100 mg dicampurkan ke dalam 10 mililiter etanol pro analysis hingga homogen. Lalu, sebanyak 1 mililiter sediaan cair tersebut dipipet kemudian diadd 1 mg serbuk magnesium serta 5 tetes HCl. Perubahan corak menjadi merah, kuning, atau jingga mengindikasikan keberadaan indikasi kandungan flavonoid pada sampel (Sari *et al.*, 2024).

c. Saponin

Sampel seberat 100 mg dilarutkan ke dalam 10 mL etanol *pro analysis* hingga homogen, kemudian sebanyak 1 mL larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL akuades. Campuran digojog selama satu menit menggunakan tabung reaksi hingga terbentuk buih. Setelah itu, sebanyak 4 tetes larutan HCl 1 M ditambahkan ke dalam campuran. Apabila buih tidak terbentuk, larutan dipanaskan selama 2–3 menit, lalu didinginkan dan dikocok kembali secara intensif. Munculnya buih yang stabil selama 8–10 menit menjadi indikator positif adanya senyawa saponin dalam sampel yang diuji (Sari *et al.*, 2024).

d. Fenolik/Tanin

Ekstrak pekat sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a., kemudian 1 mL dari sampel larutan diambil dan selanjutnya ditambahkan sejumlah 3 tetes FeCl<sub>3</sub> 1%. Reaksi ini dikategorikan sebagai bersifat positif jika muncul warna biru tua atau hijau gelap kehitaman (Sari *et al.*, 2024).

e. Terpenoid

100 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a hingga membentuk larutan homogen. Selanjutnya, sebanyak 1 mL dari larutan tersebut diambil dan ditambahkan pereaksi Bouchardat. Perubahan warna menjadi jingga kecoklatan setelah penambahan pereaksi tersebut merupakan indikator positif adanya senyawa terpenoid dalam sampel yang diuji (Sari *et al.*, 2024).

7. Uji peredaman radikal bebas DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

Larutan DPPH 0,1 mM dibuat memakai cara dilarutkan 3,9432 mg bubuk DPPH (BM 394,32) ke dalam metanol *pro analisis*, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL sampai mencapai batas volume yang ditentukan (Joangga, 2024).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan  $\lambda$  maksimum DPPH dengan 3 mL larutan DPPH lalu discanning menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda$  400-800 nm. Puncak tertinggi dengan *peak* absorbansi terbesar pada grafik hasil uji merupakan panjang gelombang maksimal (Chiyindiko *et al.*, 2022).

c. Penentuan *Operating time*

1 miliLiter kuersetin 5 ppm dicampur dengan DPPH 0,1 mM sejumlah dua miliLiter, kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan hasil serapan cahaya pada  $\lambda$  maksimum dicatat dengan selang waktu tiap 1 menit selama 60 menit (Joangga, 2024).

d. Pembuatan larutan blanko

3 miliLiter campuran DPPH 0,1 mM diukur memakai spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  maksimum dan digunakan sebagai nilai absorbansi kontrol.

e. Pembuatan larutan kuersetin (100 ppm)

10 miligram kuersetin dilarutkan dalam 100 mL metanol. Larutan kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 1, 3, 5, 7, dan 9 ppm menggunakan volume 5 mL. metanol (Djamaluddin *et al.*, 2024).

f. Pembuatan larutan sampel (1000 ppm)

Sebanyak 100 mg ekstrak uji diencerkan dalam 100 mL metanol, kemudian dibuat pengenceran larutan dengan kadar 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm dalam 5 mL methanol (Joangga, 2024).

g. Penetapan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Baku standar kuersetin dan sampel ekstrak etanol daun jeruk nipis pada bermacam-macam konsentrasi dipipet 1 mL diadddkan bersama larutan DPPH 0,1 mM dalam tabung uji sebanyak 2 mL. Larutan didiamkan dalam area gelap sepanjang waktu *Operating*

*Time*, dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang puncak (Joangga, 2024).

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

### 1. Penentuan nilai (*Inhibitory Concentration*) $IC_{50}$

Nilai absorbansi dipakai sebagai dasar dalam menentukan tingkat penghambatan (% inhibisi), yang selanjutnya dihitung dengan rumus persamaan (2).

$$\%inhibisi = \frac{A_{kontrol} - A_{sampel}}{A_{kontrol}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

A kontrol = Nilai absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimal sebelum dicampurkan dengan larutan sampel yang akan diuji.

A sampel = Nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang maksimal setelah direaksikan dengan larutan DPPH, begitu pula dengan standar.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan persamaan regresi linier. dengan %inhibisi sebagai variabel dependen (y) dan konsentrasi sebagai variabel independen (x), baik untuk larutan sampel uji maupun standar kuersetin.

$$y = bx + a \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

y = Persentase inhibisi (%)

x =  $IC_{50}$

a = *Intercept* (perpotongan garis di sumbu y)

b = *Slope* (kemiringan)

Persamaan regresi linear yang dihasilkan dipakai untuk menentukan nilai  $IC_{50}$ , dengan cara memasukkan angka 50 sebagai nilai y, sedangkan nilai x yang dihasilkan merepresentasikan  $IC_{50}$ , sesuai dengan perhitungan pada persamaan (3).

## 2. Analisis data

Hasil nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak etanol daun jeruk nipis dan standar kuersetin yang di hasilkan dianalisis dengan perangkat lunak *Statistical Product and Service Solution* (SPSS). Uji normalitas dilakukan memakai uji *Shapiro-Wilk*, serta uji keseragaman varians dengan *Levene Statistic* dengan taraf kepercayaan 95% atau nilai sig value nya  $>0,05$ . Data yang memiliki distribusi normal dan konsisten kemudian dilakukan Analisis *Independent T-test* untuk mengenali perbedaan di antara dua kelompok sampel yang tidak saling berkaitan mempunyai rata-rata yang tidak sama, dengan taraf kepercayaan jika angka sig value nya.

PEPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YAN  
YOGYAKARTA

## 3. Skema Pelaksanaan penelitian

