

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental terkait aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dan fraksi kloroform pada ekstrak etanol daun jeruk purut dengan metode FRAP.

#### **3.2 Populasi Sampel Penelitian**

a. Populasi

Daun jeruk purut segar dari Klaten, Kecamatan Jawa Tengah

b. Sampel

Ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus Hystrix D.C*)

#### **3.3 Alat dan Bahan**

**a. Alat:**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas (pyrex), neraca analitik (acys), mortir (lokal), pisau (lokal), kertas saring, corong buchner vacuum (pyrex), *rotary evaporator vacuum* (bio base), corong pisah (pyrex), desikator, oven (marnert) dan spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S).

## **b. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah aquades (*pt. brataco*), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) (merk), n-heksan (merk), standar vitamin C, HCl, etanol 96 % (medika), methanol pa,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ (merk),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , buffer asetat, TPTZ dan  $\text{FeSO}_4$ (besi II)sulfat.

## **3.4 Variabel Penelitian**

### **a. Variabel Bebas**

Variabel yang mempengaruhi atau menjadi terjadinya perubahannya atau variable terikat. Adapun variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi fraksi n-heksan dan fraksi kloroform daun jeruk purut dan vitamin C sebagai pembanding.

### **b. Variabel Terikat**

Variabel Terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dengan metode FRAP.

## **3.5 Definisi Operasional**

- a. Fraksi n-heksan dan fraksi kloroform memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Fraksi n-heksan semi polar dna fraksi kloroform non polar sehingga

dapat dilihat perbedaan hasil antara kedua fraksi yang di bandingkan dengan ekstrak etanol dan di ukur dengan parameter control positif yaitu vitamin C.

b. Konsentrasi fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut adalah konsentrasi fraksi n-heksan dan fraksi kloroform yang diukur dengan spektrofotometer UV-VIS untuk uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP.

c. Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan adalah aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut yang dinyatakan dalam nilai  $IC_{50}$ .

### **3.6 Rencana Jalannya Penelitian**

#### **3.6.1 Determinasi Tanaman**

Determinasi Daun Jeruk purut dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi. Surakarta, Jawa Tengah.

#### **3.6.2 Pembuatan ekstraksi sampel daun jeruk purut**

Simplisia daun jeruk purut yang telah diserbuk sebanyak 800 gr kemudian dimaserasi dengan menggunakan 4 liter etanol 96%. Campuran didiamkan selama 3x24 jam, setelah itu disaring. Maserat hasil dari ekstraksi dievaporasi dengan *rotary evaporatory* pada suhu 60°C hingga mendapatkan ekstrak kental daun jeruk purut (Qonitah F, 2019).

Menghitung rendemen ekstrak dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = (\text{berat ekstrak} : \text{berat simplisia}) \times 100\%$$

### 3.6.3 Uji Flavonoid dan Uji Fenolik

#### a. Uji Flavonoid

Pengujian Flavonoid dilakukan dengan dua metode, metode yang pertama dilakukan dengan larutan ekstrak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya dibasahi dengan aseton P, ditambahkan sedikit serbuk halus asam oksalat dan serbuk halus asam borat, dipanaskan diatas *waterbath*. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 10 mL eter kemudian diamati dengan sinar *UV* 366 nm, larutan berfluorosensi kuning intensif, menunjukkan adanya flavonoid (Depkes RI, 1995).

Pengujian flavonoid yang kedua dilakukan dengan 5 mL ditambahkan dengan 2 mL air panas, dididihkan Selama 5 menit. Kemudian disaring, filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg (Magnesium) dan 1 mL HCl pekat. Kemudian dikocok kuat-kuat, uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

#### b. Uji Fenolik

Sebanyak 5 mL ekstrak ditambahkan 10 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Uji positif ekstrak mengandung fenol terbentuk menghasilkan warna hitam pekat.

### 3.6.4 Fraksinasi

Proses fraksinasi merupakan proses partisi menggunakan pelarut n-heksan dan kloroform. Sebanyak 10 gr ekstrak kental dilarutkan dalam 100 mL etanol 96%. Larutan selanjutnya dipartisi dengan menambahkan 100 mL pelarut n-heksan yang kemudian digojog dalam corong pemisah dan

didiamkan selama 30-60 menit kemudian lapisan terbentuk lapisan bawah (air) dan lapisan atas (lapisan n-heksan). Fase yang diambil adalah lapisan n-heksan yang terbentuk pada lapisan atas Setelah itu fase yang diambil dipisahkan lagi di *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian dipartisi dengan menambahkan 100 mL kloroform yang kemudian digojog dalam corong pemisah dan didiamkan 30-60 menit kemudian lapisan terbentuk lapisan bawah (kloroform) dan lapisan atas (air). Fase yang diambil adalah lapisan kloroform yang terbentuk pada lapisan bawah.

### 3.6.5 Uji Antioksidan dengan Metode FRAP

Metode ini melibatkan reaksi reduksi  $Fe^{3+}$  menjadi  $Fe^{2+}$ . Proses perubahan kompleks besi (III) sianida menjadi  $Fe^{2+}$  dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda$  700nm. Perubahan dapat dilihat dari terbentuknya warna biru pada larutan. Semakin tinggi absorbansi yang terukur maka semakin tinggi kemampuan reduksinya.

#### a. Pembuatan Larutan

##### 1) Buffer Asetat

Buffer Asetat dengan pH 3,6 dibuat dari 0,775 gram natrium asetat trihidrat ( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ) yang ditambahkan dengan 4 mL asam asetat pekat dan dilarutkan dengan aquadest hingga tepat 250 mL dalam labu takar (Sammosir, 2012)

##### 2) Larutan 10 mmol/L 2,4,6-tripyridil-striazine (TPTZ)

Sebanyak 31 mg TPTZ dilarutkan dalam 40 mmol/L HCL hingga tepat 10 mL. larutan 40 mmol/L dibuat dengan melarutkan 380 $\mu$ L HCL pekat dalam 100 mL aquadest (Samosir, 2012)

3) Larutan 20 mmol/L FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O

Sebanyak 32,44 mg FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O dilarutkan dengan buffer asetat dalam labu takar hingga tepat 10 mL

4) Reagen FRAP

Reagen FRAP dibuat dengan cara mencampurkan 25 mL buffer asetat, 2,5 mL larutan TPTZ dan 2,5 larutan FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O, lalu ditambahkan aquadest hingga tepat 100 mL dalam labu takar (Samosir, 2012)

5) Pembuatan Larutan Standart FeSO<sub>4</sub>

Larutan stock 1000 ppm FeSO<sub>4</sub> dibuat dengan melarutkan 100 mg FeSO<sub>4</sub> dalam 100 mL aquadest. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 100-1000  $\mu$ mol/L (Samosir, 2012)

6) Penentuan Aktivitas Antioksidan

Beberapa seri konsentrasi 100-1000  $\mu$ mL yang telah dibuat ditambah 3 mL FRAP dan etanol pa hingga 5,0mL. Campuran divortek 30 detik dan diinkubasi selama *operating time* (30 menit). Lalu dibaca pada setiap panjang gelombang dalam kisaran 588-598 nm dengan menggunakan spektrofotometer visible (Samosir, 2012). Analisa perhitungan IC<sub>50</sub>. Perhitungan FRAP diperoleh dari data absorbansi

terhadap pengenceran seri konsentrasi Ferrous Sulfat ( $\text{FeSO}_4$ ) dan catat setara dengan  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ . Konsentrasi efektif  $\text{IC}_{50}$  dari nilai FRAP adalah konsentrasi sampel yang diperlukan untuk mengurangi  $0.5 \text{ mol Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$  (Karim *et al.*, 2014).

### 3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dan kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut dilakukan uji normalitas keseluruhan data menggunakan *Kolmogorov test* melihat distribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan *levene test* kemudian untuk mengetahui perbedaan setiap fraksi dilakukan uji *One-Way ANOVA*. Uji statistik ini untuk melihat signifikansi perbedaan aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut dengan menggunakan metode FRAP.