

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental di Laboratorium Kimia, Fakultas Sains, Teknologi, dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta dengan menentukan aktivitas antioksidan dari sampel ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

#### **3.2 Populasi dan Sampel**

Populasi pada penelitian ini adalah semua daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang diperoleh dari Klaten, Jawa tengah. Sampel pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).

#### **3.3 Instrumen Penelitian**

Instrumen penelitian adalah alat bantu yang dipilih dan digunakan oleh peneliti dalam kegiatannya mengumpulkan hasil data menjadi sistematis dan memudahkan peneliti untuk melakukan penelitian.

Instrumen penelitian ini antara lain :

- a. Alat : Timbangan analitik, tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung, gelas beaker (*pyrex*), pipet tetes (lokal), kaca objek (lokal), kuvet (*quartz kuvet*), labu ukur (*pyrex*), batang pengaduk (lokal), mikro pipet (*dragon onemed*), penggaris (lokal), spektrofotometri UV-VIS (*genesys 10*), benjana maserasi (lokal), labu erlemeyer (*pyrex*), *rotary evaporator* (*biobase*), oven (*memmert*), cawan porselen (lokal), *water bath* (*memmert*) dan serbet.
- b. Bahan : Aquadest, ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C), etanol 96% (medika), vitamin C, *buffer* asetat (merck), TPTZ,  $\text{FeCl}_3$  (merck),  $\text{FeSO}_4$  (merck), etil asetat (merck), etanol p.a (merck), aquadest pro injeksi, asam borat (brataco), asam sitrat (brataco), peter eter (brataco), HCl (merck), serbuk Mg (merck), aluminium foil, kertas saring, *tissue*

### 3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian merupakan poin yang akan menjadi karakteristik suatu penelitian. Dalam penelitian ini terdiri dari dua jenis variabel yakni variabel bebas dan variabel terikat.

a. Variabel bebas

Variabel yang mempengaruhi atau menjadi terjadinya perubahannya atau variabel terikat. Adapun variabel bebas pada penelitian ini adalah

konsentrasi ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat dan air 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 dari ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat dan air daun jeruk purut dengan metode FRAP.

### 3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional didefinisikan dengan hal yang membatasi ruang lingkup atau variabel-variabel yang diteliti. Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

a. Konsentrasi ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk purut.

- 1) Konsentrasi ekstrak etanol 96% daun jeruk purut diperoleh dari hasil maserasi serbuk daun jeruk purut dengan menggunakan pelarut etanol 96%.
- 2) Fraksi etil asetat merupakan ampas hasil dari maserasi n-Heksan yang ditambah dengan penyari lain yaitu etil asetat dan air. Kemudian dari pemisahan etil asetat dan air diambil etil asetatnya.
- 3) Fraksi air merupakan hasil dari maserasi etil asetat dan air yang telah dipisahkan etil asetatnya.

b. Aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dapat dinyatakan dalam nilai  $IC_{50}$  jika dapat meredam 50%

radikal bebas, karena Inhibition Concentration ( $IC_{50}$ ) merupakan konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan hilangnya 50% karakter radikal. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga  $IC_{50}$  yang rendah (Mendekar, 2017).

### **3.6 Rencana Jalannya Penelitian**

Rencana jalannya penelitian dalam penelitian yang dilakukan memiliki tahapan sebagai berikut.

#### **3.6.1 Pengambilan sampel**

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) segar yang dipetik di pagi hari dari daerah Dompoyongan, Jogonalan, Klaten, Jawa Tengah.

#### **3.6.2 Derterminasi tanaman**

Determinasi tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta, Jawa Tengah.

#### **3.6.3 Pembuatan ekstrak**

Simplisia daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang sudah kering sebanyak 900,08 gram dilakukan penyerbukan dan didapat hasil 720,06 gram setelah itu dimaserasi dengan menggunakan 3600,3 mL etanol 96%. Campuran didiamkan dalam bejana maserasi selama 3 x 24 jam dan dilakukan pengadukan setiap 1 x 24 jam, setelah itu disaring. Maserat hasil dari ekstraksi dievaporasi dengan *rotary evaporatory* pada suhu

60°C dilanjutkan dengan diuapkan pada *waterbath* hingga mendapatkan ekstrak kental daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) (Qonitah dan Ahwan., 2019).

Menghitung rendemen ekstrak dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

#### **3.6.4 Pembuatan Fraksi Etil Asetat dan fraksi Air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C)**

Pembuatan Fraksi bertingkat, Etil Asetat dan Air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut ekstrak kental daun jeruk purut dimasukkan dalam corong pisah, ditambahkan aquadest 25 mL dan pelarut n-heksan 25 mL. Dikocok sampai larut dan didiamkan sampai memisah. Fraksi tidak larut n-heksan difraksinasi menggunakan etil asetat 25 mL kemudian dikocok sampai larut, didiamkan dan dipisahkan antara fraksi etil asetat dan fraksi air. Direplikasi sebanyak 3 kali. Hasil fraksi diuapkan menggunakan *rotary evaporator* (Islamiati dan Puji, 2020).

#### **3.6.5 Uji kualitatif kandungan fenolik**

Uji kualitatif kandungan senyawa fenolik dilakukan dengan menimbang 1 gram sampel dan dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian menambahkan larutan FeCl<sub>3</sub> sebanyak 3 tetes dan amati perubahan warna. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam (Djamil, 2014).

### 3.6.6 Uji kualitatif kandungan flavonoid

- a. Uji kualitatif kandungan senyawa flavonoid dilakukan dengan menimbang 2 gram ekstrak kemudian masukkan kedalam beaker glass dan tambahkan 20 ml air kemudian panaskan kurang lebih 20 menit. Tambahkan 2 ml sampel kedalam tabung reaksi, 3 tetes HCl pekat pada tabung reaksi. Setelah itu tambahkan sedikit serbuk Magnesium pada tabung reaksi dan amati perubahan reaksi. Perubahan warna yang dihasilkan menjadi merah tua menandakan adanya senyawa flavonoid (Minarno, 2015).
- b. Larutan uji 1 mL diuapkan hingga kering, dibasahkan sisanya dengan aseton P, ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan serbuk halus asam oksalat P, dipanaskan di atas tangas air dan hindari pemanasan berlebihan. Eter P ditambahkan 10 mL. Larutan diamati di bawah sinar UV 366 nm berfluoresensi kuning intensif, menunjukkan adanya flavonoid (Depkes RI, 1995).

### 3.6.7 Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode FRAP

- a. Pembuatan larutan

- 1) Buffer Asetat

Buffer asetat dengan pH 3,6 terbuat dari 0,775 gram natrium asetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) yang sudah ditambahkan 4 mL asam asetat pekat kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 250 mL dilabu takar (Samosir *et al.*, 2012).

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

Ditimbang sebanyak 31 mg TPTZ kemudian dilarutkan kedalam 40 mmol/L HCl hingga 10 mL. Larutan 40 mmol/L HCl dibuat dengan melarutkan 380 PL HCl pekat kedalam 100 mL aquades (Samosir *et al.*, 2012).

3) Larutan 20 mmol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Sebanyak 32,44 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dengan buffer asetat dilabu takar hingga 10 mL (Samosir *et al.*, 2012).

4) Reagen FRAP

Membuat reagen FRAP dengan cara mencampurkan 25 mL buffer asetat, mL larutan TPTZ dan larutan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , dan ditambahkan aquades hingga 100 mL dilabu takar (Samosir *et al.*, 2012).

b. Pembuatan Larutan Standar  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Larutan stok 1000  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dibuat dengan melarutkan 100 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  kedalam 100 mL aquades. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 100-1000  $\mu\text{mol/L}$  (Samosir *et al.*, 2012).

c. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum diperoleh melalui pengukuran absorbansi dari standar  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dengan 5 seri konsentrasi 20 mL, 40 mL, 60 mL, 80 mL dan 100 mL. Dari masing-masing larutan tersebut diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan reagen FRAP sebanyak 3 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar yang

terbentuk berturut mulai dari 200, 400, 600, 800, dan 1000  $\mu\text{mol/L}$  kemudian dibaca pada setiap panjang gelombang dalam kisaran 588-598 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV- Vis (Samosir *et al.*, 2012).

#### d. Penentuan Total Antioksidan Dalam Sampel

Larutan sampel ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) sebanyak 0,1 mL ditambah reagen FRAP sebanyak 3 mL dalam tabung reaksi. Selanjutnya larutan dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya 588-598 nm (Samosir, 2012).

**Table 3.1 Parameter Aktivitas Antioksidan**

Intensitas	Nilai IC <sub>50</sub>
Sangat Kuat	<50 ppm
Kuat	50-100 ppm
Sedang	100-150 ppm
Lemah	150-200 ppm
Sangat Lemah	>200 ppm

(sumber : Molyneux, 2004)

### 3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan analisis statistik pada uji *one-way* ANOVA. Uji statistik ini untuk melihat signifikansi aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dan vitamin C sebagai pembanding dengan menggunakan metode FRAP. Pengujian diawali dengan menguji distribusi normal dengan *Saphiro Wilk Test* dan homogenitas data dengan *Levene Test*

sebagai penentu pengujian data selanjutnya dengan uji *One Way ANOVA* yang harus dilakukan untuk melihat perbedaan signifikan dari data hasil penelitian antioksidan antar sampel uji yaitu fraksi etil asetat, fraksi air, ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dan vitamin C.