

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit buah jeruk nipis.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman jeruk nipis dilakukan di Universitas Diponegoro Semarang tepatnya di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA
2. Ekstraksi kulit jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji aktivitas antioksidan pada kulit jeruk nipis di Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Waktu penelitian
Penelitian ini akan dilaksanakan dari Desember sampai Januari 2023

C. Subyek Penelitian

1. Populasi
Populasi dalam penelitian ini adalah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang berasal dari pasar Bandarrejo Kec. Ungaran Barat, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebanyak 3 kg yang berasal dari Pasar Bandarrejo Kec. Ungaran Barat, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu:

1. Metode ekstrak maserasi

Metode ekstraksi maserasi merupakan metode paling mudah dan sederhana karena pada umumnya cara melakukan maserasi dengan cara mencampurkan serbuk simplisia yang direndam dengan pelarut etanol 70%, etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan di dalam wadah tertutup rapat pada suhu kamar selama 5 hari. Maserasi juga bisa digunakan untuk pelarut polar, semipolar, dan nonpolar.

2. Ekstraksi kulit jeruk nipis

Ekstak kulit jeruk nipis yang didapat dari proses maserasi dengan variasi pelarut etanol 70%, etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan di dalam wadah tertutup rapat, diuapkan menggunakan rotary evaporator dan dipanaskan menggunakan *waterbath*.

3. DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

DPPH merupakan radikal bebas dengan massa molar relative 394.33 ($M_r C_{18}H_{12}N_5O_6 = 394.33$), bersifat stabil pada suhu kamar dan mempunyai panjang gelombang maksimum 515-517 nm. Antioksidan akan

memberikan sebagian atom hydrogen ke radikal bebas DPPH agar menjadi lebih stabil (DPPH-H).

4. Antioksidan

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menangkal efek negative radikal bebas dalam tubuh dengan memberikan satu electronnya kepada senyawa radikal bebas.

5. Etanol 70%

Etanol 70% merupakan cairan yang mengandung 70% etil alkohol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dan air 30%.

6. Etanol 96%

Etanol 96 % adalah senyawa polar yang mudah menguap sehingga baik digunakan sebagai pelarut ekstrak.

7. N-heksan

N-heksan adalah senyawa kimia dengan rumus C_6H_{14} , heksana tidak reaktif dan sering digunakan sebagai pelarut organik yang inert.

8. Etil asetat

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$. Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan tidak berwarna dan memiliki aroma khas.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah IC_{50} pada aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit jeruk nipis diukur menggunakan spektrofotometri Uv-Vis.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah proses ekstraksi, cahaya, pengadukan, dan suhu pada setiap perlakuan serta panjang gelombang absorbansi.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam proses penelitian ini terdiri dari :

Penangas air, timbangan analitik, saringan, kertas saring, sendok, labu ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas beker, pipet volume, pipet ukur, pipet tetes, kompor, rotary evaporator, batang pengaduk, pengukur suhu, blender, spektrofotometri UV-Vis.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan proses penelitian ini terdiri dari :

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), DPPH, etanol 70%, etil asetat, etanol 96%, n-heksan, pereaksi dragendroff, serbuk magnesium (Mg), asam klorida (HCl) pekat, FeCl₃ 1%, aquadest, HCl 2N dan etanol p.a

G. Alur Penelitian

1. Pembuatan simplisia

Langkah pertama yang dilakukan yaitu pembuatan simplisia Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Buah jeruk diambil kulitnya setelah itu di sortasi basah terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir, setelah di sortasi basah dilanjutkan perajangan dengan ketebalan yang diinginkan. Setelah dilakukan perajangan kulit jeruk nipis dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain berwarna hitam diatasnya, selain dikeringkan dengan sinar matahari. Simplisia kulit jeruk nipis kering dilakukan sortasi kering dengan dilakukan pemisahan antara simplisia dengan zat pengotor yang masih tersisa dan selanjutnya simplisia di blender agar didapatkan serbuk simplisia dilanjutkan dengan proses pengayakan dengan ayakan no 40 mesh.

2. Ekstraksi

Perbandingan simplisia dan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi ini adalah 5:1, 5 adalah pelarut dan 1 adalah simplisia yang digunakan. Masing-masing serbuk simplisia digunakan 250 gram yang sudah

didapatkan dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%, pelarut etil asetat, etanol 96%, dan N-heksan sebanyak 1250 ml selama 5 hari. Setelah maserasi dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain panel. Ampas yang terdapat pada masing-masing simplisia di remeserasi selama 2 hari. Setelah itu diuapkan menggunakan Rotary untuk memisahkan pelarut sampai mendapatkan ekstrak.

3. Uji kadar air simplisia dan ekstrak

Uji kadar air menggunakan oven dengan cara mengambil serbuk simplisia maupun ekstrak sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105⁰C selama 3 jam, kemudian diukur kadar airnya. Syarat kadar air yang baik ialah tidak lebih dari 10% (Sumiati *et al.*, 2019).

4. Kadar Abu pada Simplisia

Kadar abu ditetapkan dengan cara menimbang 2-3 gram serbuk simplisia dan dimasukkan ke dalam krus porselin yang sudah dipijar dan ditara lalu diratakan. Pijaran dilakukan perlahan-lahan sampai arang habis dengan suhu 600⁰C selama 3 jam. Hasil didapat lalu didinginkan dan ditimbang sampai memperoleh bobot tetap (Anggraeni, 2020).

dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100$$

5. Uji bebas Etanol

Ekstrak kulit jeruk nipis diambil sebanyak 1 gram lalu ditambahkan 1 mL Kalium dikromat dan 2 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil positif etanol ditandai dengan perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2021).

6. Pehitungan Rendemen

Rendemen adalah hasil dari pembagian berat produk yang dihasilkan dibagi berat bahan baku dan dikali 100%. (Triastiari dan Hrijono, 2019).

Rumus rendemen sebagai berikut :

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (gram)}}{\text{Berat sampel awal (gram)}} \times 100\% \text{ (Suyati, 2017)}$$

7. Parameter spesifik ekstrak

a. Organoleptis

Organoleptis pada kulit buah jeruk nipis meliputi warna, aroma, bentuk, dan rasa (Prastiwi, 2020).

b. Skrining Fitokimia

1) Uji Alkaloid

Sampel ekstrak kulit jeruk nipis diambil sebanyak 0,5 gram pada masing-masing variasi pelarut, dilarutkan dengan asam klorida 2 mL, dipanaskan selama 5 menit, dan disaring. Filtrat yang didapatkan dimasukkan ke tabung reaksi dan diberi pereaksi dragendroff 2-3 tetes. Jika sampel positif mengandung alkaloid

akan ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna coklat (Noval *et al.*, 2019).

2) Flavonoid

Ekstrak kulit jeruk nipis ditimbang sebanyak 0,5 gram pada masing-masing variasi pelarut, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dalam 1 mL etanol 96%, kemudian ditambahkan serbuk magnesium (Mg) sebanyak 0,1 gram dan 10 mL asam klorida (HCl) pekat. Jika terjadi suatu perubahan warna merah jingga atau merah ungu pada hasil reaksi, sampel menunjukkan bahwa mengandung senyawa flavonoid (Vonna *et al.*, 2021).

3) Tanin

Ekstrak diambil sebanyak 0,5 gram pada masing-masing variasi pelarut kemudian ditetes dengan FeCl_3 1%. Apabila terjadi suatu perubahan dengan munculnya warna biru kehitaman atau hijau kecokelatan maka mengandung tanin (Yuningtyas *et al.*, 2021).

4) Fenolik

Diambil 0,5 gram ekstrak kulit jeruk nipis pada masing-masing variasi pelarut dilarutkan dalam etanol 96% dan ditambahkan 5 mL aquadest, kemudian disaring dan dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 5 tetes FeCl_3 1%. Jika berwarna biru/biru hitam menunjukkan hasil positif senyawa fenol (Puspitasari & Wulandari, 2017).

5) Saponin

Diambil ekstrak kulit jeruk nipis sebanyak 0,5 gram pada masing-masing variasi pelarut lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan HCl 2N sebanyak 5 mL. Larutan didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 30 detik. Apabila terbentuk busa yang tidak hilang selama 30 detik menyatakan bahwa adanya saponin (Cholidah *et al.*, 2020).

8. Pembuatan DPPH

a. Perhitungan DPPH 0,4mM

$$\text{Perhitungan Molaritas} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V}$$

$$0,0004 \text{ Molaritas} = \frac{\text{gram}}{394,32} \times \frac{1000}{25 \text{ ml}}$$

$$0,0004 \text{ Molaritas} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr}} \times 40$$

$$\text{Molaritas} = \frac{0,0004 \text{ M} \cdot 394,32}{40} = 0,0039 \text{ gram}$$

b. Pembuatan larutan DPPH 0,4mM

Ditimbang sebanyak 0,0039 gram DPPH yang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,4mM (Sami & Rahimah, 2015).

9. Pengujian DPPH

a. Penentuan Panjang Gelombang DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

Larutkan DPPH 0,4 mM sebanyak 2 mL dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan etanol p.a sebanyak 2 mL, kocok

dengan vortex hingga homogen lalu dituangkan ke dalam kuvet dan diukur panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Musfiroh & Syarief, 2009).

b. Penentuan *Operating Time* DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

Penentuan *operating time* dengan cara mengambil 2 mL larutan DPPH 0,4 mM dan ditambahkan larutan standar kuersetin 3 ppm sampai tanda batas labu ukur 5 mL. Kemudian larutan tersebut diukur absorbansinya pada gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai serapan stabil (Bakti *et al*, 2017).

c. Pembuatan larutan blanko

Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 2 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan etanol p.a sebanyak 2 mL, dikocok dengan vortex hingga homogen, diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit (Molyneux, 2016).

d. Pembuatan kurva baku kuersetin

Kurva baku diawali dengan pembuatan larutan baku kuersetin 1000 ppm dengan cara menimbang sebanyak 25 mg kuersetin kemudian dilarutkan sebanyak 25 mL etanol p.a. Setelah itu larutan baku diencerkan menjadi larutan seri kadar dengan kadar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Sebanyak 1 mL larutan standart DPPH 0,4 mM, ditambahkan 1 mL larutan standar kuersetin kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml, lalu

diinkubasi di tempat yang gelap selama 15 menit, setelah itu pembacaan absorbansi seri kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan gelombang maksimum (Susiloningrum & Sari, 2021).

10. Pengujian Antioksidan

Ekstrak kulit jeruk nipis diambil sebanyak 100 mg pada masing-masing variasi pelarut, dilarutkan dengan etanol p.a 100 mL, kemudian larutan ekstrak kulit jeruk nipis di encerkan menjadi seri kadar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm, setelah itu pada setiap konsentrasi di ambil 1 mL dan ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM lalu ditambahkan etanol p.a 3 ml dikocok hingga homogen. Pengujian dilakukan dengan cara memipet 1 mL larutan dengan berbagai konsentrasi, kemudian diinkubasi di tempat yang gelap selama beberapa menit, setelah itu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan gelombang maksimum.

H. Analisis Data

Untuk mengetahui perhitungan kadar aktivitas antioksidan menggunakan persamaan regresi linier $y = a + bx$, konsentrasi sampel sebagai sumbu (x) dan % inhibisi sebagai sumbu (y) (Aminah *et al.*, 2016). Analisis data yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan pada kulit buah jeruk nipis dianalisis menggunakan program SPSS dengan uji *oneway ANOVA*. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro wilk* karena sampel kurang dari 50, suatu data yang dikatakan berdistribusi normal dengan nilai signifikan $> 0,005$ (Suardi, 2019).