

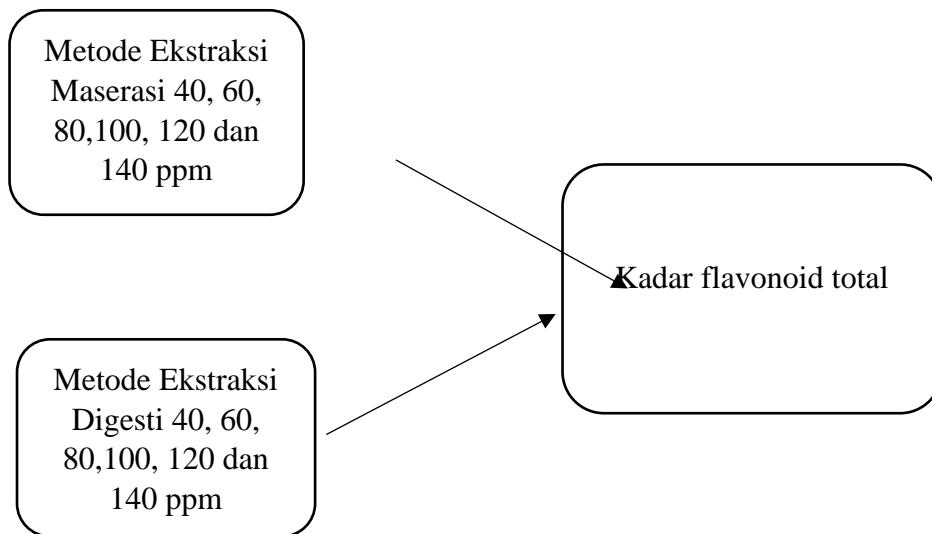
BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Dalam penelitian ini yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium.

Desain penelitian terdapat pada bagan 3.1



Bagan 1.1 Desain Penelitian

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
3. Uji kuantitatif dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo Ungaran

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) yang dipanen dari Kecamatan Juwangi, Kabupaten Boyolali.

2. Sampel

Sampel Daun Jeruk Purut Segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 4 kg. Kriteria daun jeruk purut yang dipilih yaitu berwarna hijau tua dengan kilau mengkilap dan buah berwarna hijau cerah (Ratsewo *et al.*, 2016).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat mempengaruhi variabel lain, dalam penelitian ini variabel bebasnya adalah metode ekstraksi maserasi dan digesti.

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kadar flavonoid total ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC).

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu suhu pada setiap perlakuan, waktu ekstraksi dan volume pelarut pada saat ekstraksi.

D. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Metode	Hasil	Skala
1	Simplisia Daun Jeruk Purut	Simplisia daun jeruk purut merupakan simplisia yang diperoleh dari daun jeruk purut asal Kecamatan Juwangi yang diproses dengan metode pengeringan matahari tidak langsung.	-	-	-
2	Metode Ekstraksi Maserasi	Ekstrak daun jeruk purut diperoleh dari ekstraksi metode maserasi.	-	-	-
3	Metode Ekstraksi Digesti	Ekstrak daun jeruk purut diperoleh dari ekstraksi metode digesti.	-	-	-
4	Kadar Flavonoid Total	Kadar Flavonoid total diperoleh dari ekstrak daun jeruk purut dengan metode ekstraksi maserasi dan digesti.	AlCl ₃	mgQE/g	Rasio

E. Pengumpulan Data

1. Alat

Pada penelitian ini alat yang digunakan yaitu Pisau, Blender (Cosmos), Timbangan analitik (Matrix), Kain Flanel, Kertas saring (Whatman no.42), Seperangkat alat gelas (Pyrex), Pipet tetes, Spatula, Pipet ukur, Wadah maserasi, Tanur, Hotplate (IKA C-MAG HS7), Termometer, Waterbath, Cawan porselen, Rotary

evaporator (Ika RV10 Digital V), Labu ukur, Kuvet, Tabung reaksi, Oven dan Spektrofotometri Uv-Vis (Shimadzu UV-1800).

2. Bahan

Pada penelitian ini bahan yang digunakan yaitu Simplisia daun jeruk purut asal Kabupaten Boyolali, etanol 96% (farmasetis), etanol (pro analisis), AlCl_3 10%, kuersetin (*sigma Aldrich*), Aquadest, Asam Sulfat pekat (pro analisis), Kalium dikromat (farmasetis) dan Asam asetat 5% (farmasetis).

F. Prosedur penelitian

1. Preparasi sampel

Sampel daun jeruk purut segar yang tua dikumpulkan, sampel yang diperoleh dipisahkan dari pengotor. Sampel kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Setelah itu, sampel ditiriskan hingga air pada daun hilang. Sampel yang sudah ditiriskan kemudian dipotong kecil-kecil. Sampel kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam. Daun yang sudah kering kemudian di sortasi kering (Ariani *et al.*, 2022). Simplisia yang sudah kering di haluskan dengan menggunakan blender kemudian diayak menggunakan ayakan mesh no 40.

2. Parameter uji Non Spesifik Simplisia

a. Uji kadar air simplisia

Panaskan cawan menggunakan oven selama 20 menit dengan suhu 105°C . Kemudian dinginkan cawan menggunakan desikator selama 30 menit, lalu timbang cawan kosong dengan neraca analitik. Setelah itu, timbang 2 gram simplisia, masukkan ke dalam cawan, panaskan pada suhu 105°C menggunakan oven selama 4 jam. Setelah proses pemanasan selesai, dinginkan dengan desikator selama 30

menit dan timbang cawan dengan simplisia (Wandira *et al.*, 2023). Hitung dengan rumus sebagai berikut :

$$Kadar\ air = \frac{b - (c - a)}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

a = Berat cawan

b = Berat sampel

c = Berat cawan + sampel

b. Uji kadar abu simplisia

Timbang simplisia sebanyak 2 gram, masukkan ke dalam krus silikat, pijarkan dalam tanur selama 3 jam pada suhu 400°C, lalu didinginkan dan ditimbang (Narsa *et al.*, 2022). Hitung kadar abu dengan rumus persamaan :

$$Kadar\ abu = \frac{x - a}{w} \times 100\%$$

Keterangan :

a = Berat cawan (g)

w = Berat sampel awal (g)

x = Berat cawan + abu (g)

3. Proses pembuatan ekstrak

Pada penelitian ini simplisia dilakukan ekstraksi dengan 2 variasi metode yaitu maserasi dan digesti. Pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi adalah etanol 96 % (Qonitah *et al.*, 2022).

a. Maserasi

Serbuk simplisia daun jeruk purut ditimbang sebanyak 300 gram. Pelarut yang digunakan pada proses maserasi sebanyak 1500 ml. Maserasi dilakukan dengan menggunakan etanol 96%. Simplisia daun jeruk purut dimaserasi dengan 1500 ml etanol 96% selama 2x24 jam (Kurniawati *et al.*, 2016). Pada saat proses maserasi, dilakukan pengadukan setiap 6 jam selama 5 menit dan dilakukan remaserasi dengan pelarut sebanyak 600 ml selama 1x24 jam. Setelah itu, dilakukan penyaringan dan filtrat yang diperoleh kemudian di uapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40-50°C dan waterbath pada suhu 40-50°C, hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian ditimbang dan hitung rendemennya (Ariani *et al.*, 2022).

Perhitungan rendemen dapat dihitung menggunakan rumus :

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

b. Digesti

Serbuk simplisia daun jeruk purut ditimbang sebanyak 300 gram. Pelarut yang digunakan yaitu sebanyak 2100 ml. Masukkan serbuk simplisia ke dalam Erlenmeyer. Tambahkan pelarut etanol 96% ke dalam Erlenmeyer. Selanjutnya lakukan dengan merebus serbuk simplisia diatas *hot plate* pada suhu 40-50°C. Sampel diaduk dengan kecepatan ± 1000 rpm selama 3 jam, Kemudian disaring hingga diperoleh ekstrak cair (Putri *et al.*, 2022). Ekstrak kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40-50°C dan diuapkan dengan waterbath pada suhu 40-50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Perhitungan rendemen dapat menggunakan rumus :

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

4. Uji kadar air ekstrak

Panaskan cawan menggunakan oven selama 20 menit dengan suhu 105 °C. Kemudian dinginkan cawan menggunakan desikator selama 30 menit, lalu timbang cawan kosong, masukkan 2 gram ekstrak ke dalam cawan. Keringkan dengan oven pada suhu 110°C selama 5 jam, kemudian dinginkan menggunakan desikator. Timbang hingga memperoleh bobot tetap (Waty *et al.*, 2021).

$$Kadar\ air = \frac{b - (c - a)}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

a = Berat cawan

b = Berat sampel

c = Berat cawan + sampel

5. Uji bebas etanol

Masukkan ekstrak kental ke dalam tabung reaksi, tambahkan 1 ml kalium dikromat dan 2 ml asam sulfat . Apabila terjadi perubahan warna jingga menjadi hijau kebiruan, maka ekstrak mengandung etanol (Luz *et al.*, 2021).

6. Uji kualitatif flavonoid

Sampel ekstrak daun jeruk purut ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian tambahkan aquadest 20 ml, didihkan dan saring filtrat sebanyak 0,5 ml, tambahkan 5 ml AlCl₃ 10%, Apabila sampel berubah menjadi kuning menunjukkan positif mengandung flavonoid (Marpaung & Wahyuni, 2018).

7. Uji kuantitatif penetapan kadar Flavonoid total

a. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin (1000 Ppm)

Timbang serbuk kuersetin sebanyak 25 mg, kemudian larutkan dengan etanol p.a sampai volume 25 mL.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum

Ambil larutan baku kuersetin 100 ppm sebanyak 1 ml, tambahkan dengan 1 ml AlCl_3 10 % dan 8 ml asam asetat 5%. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan dengan *running* larutan kuersetin pada range panjang gelombang 400 - 450 nm (Aminah *et al.*, 2017)

c. Penentuan *operating time*

Ambil larutan baku kuersetin 100 ppm sebanyak 1 ml, tambahkan dengan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Ukur absorbansi larutan tersebut pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval pada waktu 0-30 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Ramadhani *et al.*, 2020).

d. Penentuan kurva baku kuersetin

Larutan baku standar kuersetin 1000 ppm disiapkan dalam seri kadar 40, 60, 80, 100, 120 dan 140 ppm, diambil 1 ml larutan seri kadar dari masing-masing konsentrasi direaksikan dengan 1 ml AlCl_3 10% dan asam asetat 5 % sebanyak 8 ml, didiamkan selama waktu optimum. Pembacaan absorbansi seri kadar dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada Panjang gelombang maksimum (Ramadhani *et al.*, 2020).

e. Penentuan kadar flavonoid total dengan spektrofotometri Uv-Vis

Larutan ekstrak 1000 ppm dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 10 mg, kemudian larutkan dengan etanol p.a sampai volume 10 mL. Ambil 1 ml larutan ekstrak 1000 ppm, kemudian tambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan asam asetat 5% sebanyak 8 ml. Lakukan pembacaan absorbansi pada Panjang gelombang maksimum. Lakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Ramadhani *et al.*, 2020) .

G. Analisis Data

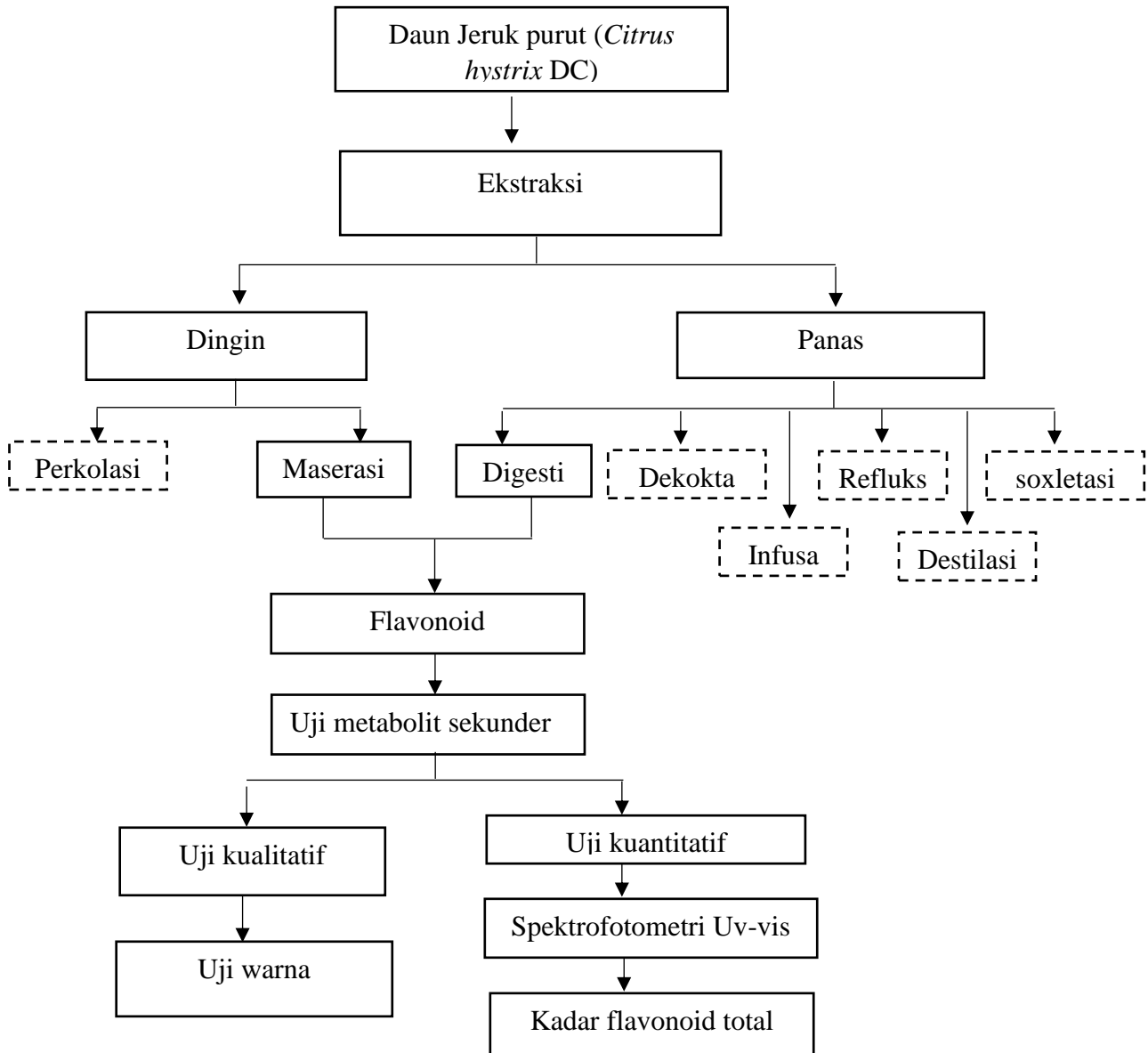
Analisis data pada penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi terhadap kadar flavonoid total pada ekstrak daun jeruk purut. Sampel dilakukan

analisis secara kualitatif dengan uji warna untuk membuktikan adanya kandungan flavonoid. Selanjutnya dilakukan pengujian secara kuantitatif dengan menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis untuk menentukan kadar flavonoid dari kedua variasi metode ekstraksi. Pengujian dilakukan dengan pembacaan absorbansi yang didapat dari data pembuatan linearitas kurva kalibrasi menggunakan spektrofotometri Uv-Vis dan dilakukan perhitungan yang selanjutnya diperoleh persamaan regresi $y = bx + a$. Perhitungan kadar flavonoid total pada kedua metode ekstraksi dilakukan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{V.C.f.p}{g}$$

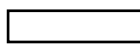
Hasil kadar flavonoid total yang didapatkan kemudian dilakukan analisis menggunakan SPSS. Data kadar flavonoid total diuji normalitas dengan menggunakan *shapiro wilk*, apabila hasil $p > 0,05$ maka data terdistribusi normal. Selanjutnya diuji homogenitas, apabila hasil $p > 0,05$ menunjukkan data homogen. Kemudian dilakukan uji *T Test* untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi terhadap kadar flavonoid total, apabila hasil yang didapatkan $p < 0,05$ maka terdapat pengaruh yang signifikan antara kedua metode tersebut.

H. Alur Penelitian

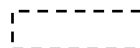


Bagan 3.2 Alur Penelitian

Keterangan :



= Dilakukan penelitian



= Tidak dilakukan penelitian