

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

#### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan buah stroberi (*Fragaria vesca* L.) yang diperoleh dari kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

#### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian *exsocarp* kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diambil dari perkebunan warga desa Kebak, kecamatan Kebakkramat, kabupaten Karanganyar yang diambil secara acak dipilih buah yang tidak busuk, matang dan berwarna hijau tua, sedangkan buah stroberi (*Fragaria vesca* L.) yang diambil dari perkebunan desa Blumbang, kecamatan Tawangmangu, kabupaten Karanganyar yang diambil secara acak yang berwarna merah, matang dan tidak busuk.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi yang sebelumnya sudah dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan kombinasi (1:1), (1:3), (3:1).

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi dengan metode DPPH.

#### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Ada banyak cara untuk mengkategorikan faktor utama yang teridentifikasi, termasuk variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

**2.1 Variabel bebas.** Variabel bebas adalah salah satu yang dimanipulasi dengan sengaja untuk melihat bagaimana pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Kombinasi dengan perbandingan (1:1), (1:3), dan (3:1) antara kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi dijadikan sebagai variabel bebas dalam penelitian ini.

**2.2 Variabel tergantung.** Variabel tergantung yang dimaksud dalam penelitian ini adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria peneliti. Aktivitas antioksidan yang diuji dengan metode DPPH digunakan sebagai variabel tergantung dalam penelitian ini.

**2.3 Variabel terkontrol.** Variabel terkontrol yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel terikat selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh tidak dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah prosedur uji aktivitas antioksidan ekstrak kombinasi kulit buah jeruk nipis dan ekstrak buah stroberi dan kondisi penelitian.

### C. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan buah stroberi (*Fragaria vesca* L.) dari Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, kulit buah jeruk nipis diambil bagian *exsocarp* dipilih dari buah yang tidak busuk, matang dan berwarna hijau tua.

Ketiga, buah stroberi dipilih yang berwarna merah, matang, dan tidak busuk.

Keempat, ekstrak kulit buah jeruk nipis adalah hasil dari maserasi 450 gram serbuk kulit buah jeruk nipis dengan pelarut 96%.

Keempat, ekstrak buah stroberi adalah hasil maserasi 450 gram serbuk buah stroberi dengan pelarut etanol 96%.

Kelima, kombinasi ekstrak kulit buah jeruk nipis dan ekstrak buah stroberi 1:1 adalah hasil dari ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis sebanyak 25 mg : ekstrak etanol buah stroberi sebanyak 25 mg dengan pelarut etanol *p.a.*

Keenam, kombinasi ekstrak kulit buah jeruk nipis dan ekstrak buah stroberi 1:3 adalah hasil dari ekstrak kulit buah jeruk nipis sebanyak 25 mg : ekstrak etanol buah stroberi sebanyak 75 mg dengan pelarut etanol *p.a.*

Ketujuh, kombinasi ekstrak kulit buah jeruk nipis dan ekstrak buah stroberi 3:1 adalah hasil dari ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis sebanyak 75 mg : ekstrak etanol buah stroberi sebanyak 25 mg dengan pelarut etanol *p.a.*

Kedelapan, penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, pengujianya dengan membuat ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak dari kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi dengan perbandingan kombinasi (1:1); (1:3); (3:1) yang dilakukan uji menggunakan spektrofotometer UV-VIS kemudian dilihat absorbansinya dan dihitung nilai  $IC_{50}$ .

Kesembilan, Nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitor Concentration*) adalah konsentrasi dari ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi yang

diperlukan untuk menghambat 50% radikal bebas terhadap DPPH.

Kesepuluh, persen inhibisi (% inhibisi) merupakan gambaran kemampuan senyawa aktioksidan dari ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi untuk menangkal radikal bebas terhadap DPPH.

## D. BAHAN

### 1. Bahan dan Alat

#### 1.1 Bahan alami

Bahan alami yang digunakan pada penelitian ini antara lain kulit buah jeruk nipis, buah stroberi, dan air panas.

#### 1.2 Bahan kimia

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain etanol 96%, HCl pekat, FeCl<sub>3</sub>, HCl 2N, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, reagen Bourchardat, eter, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, KMnO<sub>4</sub>, DPPH, serbuk vitamin C, etanol *p.a.*

### 2. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa alat diantaranya seperti oven (Memmert), ayakan *mesh 40*, timbangan analitik (OHAUS), botol timbang, kurs porselen, *stopwatch*, kertas timbang, desikator, gelas ukur, penjepit botol timbang, *beaker glass*, botol maserasi, kain flannel, kertas saring, *rotary evaporator*, vortex, tabung reaksi, rak tabung reaksi, plat tetes, hot plate, kaca arloji, pipet tetes, pipet volume, mikropipet, labu tentukur, kuvet, Spektrofotometer UV-VIS, laptop, program SPSS versi 25.

## E. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi Tanaman

Langkah pertama yang dikerjakan pada penelitian kali ini yaitu dengan memastikan kebenaran dari tanaman jeruk nipis dan stroberi yang akan dipakai pada penelitian ini. Determinasi tanaman dilakukan berkaitan dengan tanda morfologis yang ada pada tanaman jeruk nipis dan stroberi. Determinasi tanaman nipis dan stroberi dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu.

### 2. Persiapan Sampel

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia edisi II, pembuatan sampel pada kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi sebagai berikut :

**2.1 Sampel Kulit Buah Jeruk Nipis.** Kulit buah jeruk nipis sebanyak 2 kg dibersihkan dari kotoran yang menempel pada kulitnya di bawah air mengalir sampai bersih dan ditiriskan. Kulit buah jeruk nipis

kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat yang tidak terkena cahaya matahari langsung dan ditutupi dengan kain yang berwarna hitam. Setelah simplisia kering, diblender dan diayak dengan ayakan *mesh* 40. Serbuk yang belum lolos ayakan, diblender kembali dan diayak sampai semua serbuk lolos ayakan (Khasanah *et al.*, 2014)

**2.2 Sampel buah Stroberi.** Buah stroberi sebanyak 6 kg dicuci dan ditiriskan untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran yang menempel di kulit. Stroberi dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan dengan dipanaskan menggunakan oven suhu 40°C. Simplisia buah stroberi dibuat serbuk dengan menggunakan blender, serbuk yang dihasilkan kemudian diayak menggunakan ayakan *mesh* 40 hingga diperoleh serbuk yang halus. Serbuk yang masih belum lolos ayakan diblender kembali dan diayak hingga semua lolos ayakan. Hasil serbuk dimasukkan ke dalam wadah gelas tertutup (Inggrid dan Santoso, 2015).

### 3. Penetapan Susut Pengerinan

Metode susut pengerinan menurut Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, menimbang masing-masing sampel sebanyak 1 sampai 2 gram kemudian dimasukkan dalam botol timbang yang berbeda. Masing-masing sampel dibuat tiga kali replikasi. Botol timbang yang digunakan sebelumnya harus sudah dipanaskan dalam oven 105°C dan ditara. Sampel diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga lapisan sampel dalam botol memiliki ketebalan kurang lebih 5-10 mm. Sampel dikeringkan hingga mencapai bobot konstan dengan cara dioven pada suhu 105°C dengan tutup botol timbang terbuka. Botol timbang ditutup terlebih dahulu kemudian ditempatkan dalam desikator untuk didinginkan sebelum ditimbang dan hasilnya dicatat. Penyusutan pengerinan sampel dihitung menggunakan rumus berikut, yang didasarkan pada hasil penimbangan:

$$\text{susut pengerinan} = \frac{\text{bobot sampel basah} - \text{bobot sampel kering}}{\text{bobot sampel basah}} \times 100\%$$

### 4. Pembuatan Ekstrak

Menurut Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, pembuatan ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi dengan cara menimbang serbuk kulit buah jeruk nipis dan serbuk buah stroberi masing-masing sebanyak 450 gram, serbuk dimasukkan ke dalam botol maserasi yang berbeda, kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 4,5 liter. Ekstraksi dilakukan selama 24 jam dengan pengadukan sesekali pada 6 jam pertama kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat dikumpulkan, kemudian disaring dengan kain flannel dan ampas ditambah dengan

etanol 96% sebanyak 2,25 liter. Dilakukan ekstraksi kembali sambil diaduk secara berulang-ulang hingga mencapai 1000 mL. Setelah itu ekstrak disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi. Menghitung rendemen yang didapatkan dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

## 5. Penetapan Kadar Air Ekstrak

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia edisi II, pembuatan sampel pada kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi sebagai berikut :

**5.1 Kadar air ekstrak kulit buah jeruk nipis.** Mengisi 200 mL toluene dan 2 mL air kedalam labu destilasi. Campuran tersebut dipanaskan selama 2 jam dan didinginkan selama 30 menit. Volume tersebut dicatat sebagai  $n_0$ . Serbuk kulit buah jeruk nipis ditimbang sebanyak yang diperkirakan mengandung 2-3 mL air (w), dimasukkan ke dalam labu destilasi. batu didih ditambahkan ke labu destilasi. Dipanaskan selama 15 menit dan laju destilasi diatur menjadi dua tetes per detik hingga sebagian besar air telah terdestilasi, kemudian diatur menjadi empat tetes per detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena dan penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima kemudian dibiarkan mendingin hingga suhu kamar, bila ada tetesan air yang melekat pada pendingin maka tabung digosok dengan karet yang diikatkan pada kawat tembaga dan dibasahi toluena hingga tetesan air turun. Volume air diukur sebagai volume destilasi kedua ( $n_1$ ). Kadar air dihitung dengan persamaan berikut :

$$\text{kadar air (\%)} = \frac{\text{Vol. air yang terdestilat}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

**5.2 Kadar Air Ekstrak buah stroberi.** Menimbang ekstrak buah stroberi kurang lebih sebanyak 10 gram ( $W_0$ ), kemudian dimasukkan ke dalam kurs porselen dan sebelumnya telah ditara ( $W_1$ ). Kurs porselen yang berisi sampel dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam kemudian ditimbang. Pengovenan dan penimbangan dilakukan kembali selang waktu 1 jam ( $W_2$ ) sampai mencapai bobot konstan atau memiliki perbedaan antara dua penimbangan secara berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2017). Penetapan kadar air ekstrak dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{kadar air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

## 6. Skrining Fitokimia

6.1 **Uji flavonoid.** Memasukkan 0,5 gram masing-masing ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi kedalam tabung reaksi yang berbeda dan dilarutkan dengan 2 mL etanol 96% kemudian diaduk. menambahkan serbuk magnesium 0,5 gram dan 3 tetes HCl pekat. Hasil pengujian apabila terbentuk warna jingga sampai merah menunjukkan adanya senyawa flavon, apabila terbentuknya warna jingga sampai merah keunguan menunjukkan flavonon (Bahriul *et al.*, 2014).

6.2 **Uji saponin.** 0,5 gram ekstrak kulit buah jeruk nipis dan 0,5 gram ekstrak buah stroberi ditimbang, dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, masing-masing diisi dengan 10 mL air panas. Hasil positif mengandung saponin, apabila pada pengujian terbentuk busa kurang dari 10 menit serta pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, busa tidak hilang (Bahriul *et al.*, 2014).

6.3 **Uji tanin.** Menimbang masing-masing ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi sebanyak 0,5 gram, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, dikocok dengan air panas sampai homogen kemudian ditambahkan  $\text{FeCl}_3$ . Hasil positif mengandung tanin, apabila terbentuk warna hijau sampai biru kehitaman (Bahriul *et al.*, 2014).

6.4 **Uji alkaloid.** Menimbang masing-masing ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi sebanyak 0,5 gram, dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditetesi HCl 2 N dan bagi menjadi 3 tabung reaksi. Tabung reaksi masing-masing diisi 0,5 mL larutan sampel + HCl 2N kemudian tabung reaksi 1 ditambah 2 tetes pereaksi Mayer, tabung reaksi 2 ditambah 2 tetes pereaksi Bouchardat, dan tabung reaksi 3 ditambah 2 tetes pereaksi Dragendorff. Hasil positif mengandung alkaloid, jika pada tabung reaksi dengan penambahan pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih atau kuning. Pada tabung reaksi dengan penambahan pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan jingga (Bahriul *et al.*, 2014).

6.5 **Uji terpenoid dan steroid.** Menimbang masing-masing ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi sebanyak 0,5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda dan ditambahkan eter sedikit dan dikocok. Mengambil lapisan eter, kemudian ditetaskan pada plat tetes, dibiarkan hingga mengering. Setelah mengering ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Hasil positif mengandung terpenoid, apabila terbentuk

warna orange, merah atau kuning. Hasil positif mengandung steroid, jika hasil pengujian terbentuk warna hijau (Panaungi, 2018).

**6.6 Uji antosianin.** Ekstrak dari kulit buah jeruk nipis dan stroberi ditimbang masing-masing sebanyak 0,5 gram sebelum ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi beberapa tetes NaOH 2M. Hasil positif mengandung antosianin ditandai dengan perubahan warna merah menjadi warna hijau biru yang lama kelamaan akan memudar (Hayati *et al.*, 2015).

**6.7 Uji vitamin C.** Mengambil masing-masing ekstrak kental kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 5 mL aquadest dikocok sampai homogen. Ditambahkan  $\text{KMnO}_4$  0,1% 10 mL. Hasil positif adanya vitamin C pada sampel ditandai dengan timbulnya warna coklat (Yuliasuti *et al.*, 2019).

**6.8 Uji minyak atsiri.** Ekstrak kental kulit buah jeruk nipis seberat 0,5 gram diencerkan dengan 1 ml etanol 96% sebelum dipanaskan di atas hotplate di atas kaca arloji untuk mendapatkan residu. Hasil positif adanya minyak atsiri dalam sampel ditandai dengan bau khas yang dihasilkan oleh residu tersebut (Rukmini *et al.*, 2019).

## **7. Kombinasi Ekstrak**

Menimbang 25 mg ekstrak kulit buah jeruk nipis dan 25 mg ekstrak buah stroberi kemudian dimasukkan ke dalam wadah tertutup dan dilarutkan dengan etanol *p.a* ad 50 mL kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 1 menit, hasil pencampuran merupakan kombinasi ekstrak 1:1.

Menimbang 25 mg ekstrak kulit buah jeruk nipis dan 75 mg ekstrak buah stroberi kemudian dimasukkan ke dalam wadah tertutup dan dilarutkan dengan etanol *p.a* ad 100 mL kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 1 menit, hasil pencampuran merupakan kombinasi ekstrak 1:3.

Menimbang 75 mg ekstrak kulit buah jeruk nipis dan 25 mg ekstrak buah stroberi kemudian dimasukkan ke dalam wadah tertutup dan dilarutkan dengan etanol *p.a* ad 100 mL kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 1 menit, hasil pencampuran merupakan kombinasi ekstrak 3:1.

## **8. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak dengan DPPH**

Berdasarkan penelitian dari Pandanwangi *et al* (2018), uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan dengan cara berikut :

8.1 **Pembuatan blanko DPPH 0,4 mM.** Menimbang 15,8 mg DPPH lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL dan ditambahkan dengan etanol *p.a* sampai tanda batas sehingga diperoleh blanko DPPH 0,4 mM. Blanko yang telah dibuat disimpan ditempat yang gelap.

8.2 **Pembuatan kadar sampel.** Menimbang ekstrak tunggal kulit buah jeruk nipis, ekstrak tunggal buah stroberi, dan kombinasi ekstrak kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi dengan perbandingan (1:1); (1:3); (3:1). Ekstrak tunggal kulit buah jeruk nipis dan buah stroberi masukkan ke dalam labu tentukur 50 ml, ekstrak kombinasi (1:1) dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL dan ekstrak kombinasi (1:3) dan (3:1) dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 ml kemudian ditambahkan etanol *p.a ad* tanda batas. Kadar masing-masing sampel sebesar 1000 mg/L. Dari larutan induk dengan kadar 1000 mg/L tersebut dilakukan pengenceran 100 mg/L dan dibuat seri konsentrasi 10; 20; 30 dan 40 mg/L sebanyak 10 mL.

8.3 **Pembuatan pembanding vitamin C.** Menimbang vitamin C sebanyak 5 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan vitamin C dengan kadar 100 mg/L. Dari larutan pembanding 100 mg/L tersebut dibuat seri konsentrasi sebesar 10; 20; 30 dan 40 mg/L sebanyak 10 mL.

8.4 **Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH 0,4 mM.** Memasukkan 3 mL larutan DPPH 100 ppm, ditambahkan 3 mL etanol dikocok hingga homogen kemudian dimasukkan ke dalam kuvet lalu dikur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 400-700 nm. Panjang gelombang maksimal yang diperoleh sampai didapatkan absorbansi yang stabil dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi.

8.5 **Penetapan *operating time* larutan DPPH 0,4 mM.** Memipet 3 mL baku pembanding vitamin C kemudian ditambahkan 3 mL larutan DPPH 0,4 mM dan dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit dan mengukur absorbansinya pada menit ke-0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; dan 60 dengan panjang gelombang maksimal yang sudah ditentukan.

8.6 **Pembuatan larutan blanko.** Masukkan 3 ml larutan DPPH ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan etanol *p.a*

sebanyak 3 ml, dikocok sampai homogen dan disimpan ditempat gelap sesuai dengan *operating time*.

**8.7 Pengukuran aktivitas antioksidan vitamin C terhadap Radikal bebas DPPH.** Memipet 3 mL baku pembanding vitamin C, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 mL larutan DPPH 0,4 mM. Dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit sampai homogen, lalu didiamkan ditempat gelap sesuai dengan *operating time*. Absorbansinya dibaca pada panjang gelombang maksimal.

**8.8 Pengukuran aktivitas antioksidan sampel terhadap Radikal bebas DPPH.** Memipet 3 mL masing-masing sampel, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda-beda, kemudian ditambahkan 3 mL larutan DPPH 0,4 mM. Dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit sampai homogen, lalu didiamkan ditempat gelap sesuai dengan *operating time*. Absorbansinya dibaca pada panjang gelombang maksimal.

#### F. Analisis Hasil

Nilai absorbansi yang muncul pada pengujian aktivitas antioksidan sampel, dihitung nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan ekstrak dihitung sebagai persen peredaman dengan rumus :

$$\% \text{peredaman} = \frac{\text{abs. blanko} - \text{abs. sampel}}{\text{abs. blanko}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs. blanko = absorbansi tidak mengandung sampel

Abs. sampel = absorbansi sampel (Vitamin C atau sampel + DPPH)

Data yang diperoleh diolah dengan analisa probit menggunakan program SPSS versi 25. Analisa probit digunakan untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$ , dengan menggunakan log konsentrasi larutan uji (x) dan persentase aktivitas antioksidan (y). Perbedaan aktivitas antioksidan antara ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak dilihat dengan melakukan uji Tukey.