

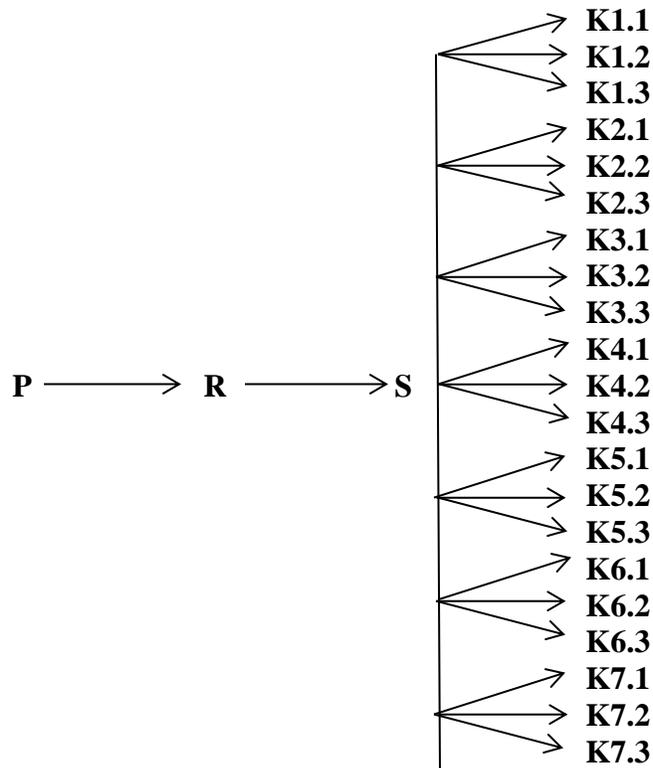
BAB 3
METODE PENELITIAN

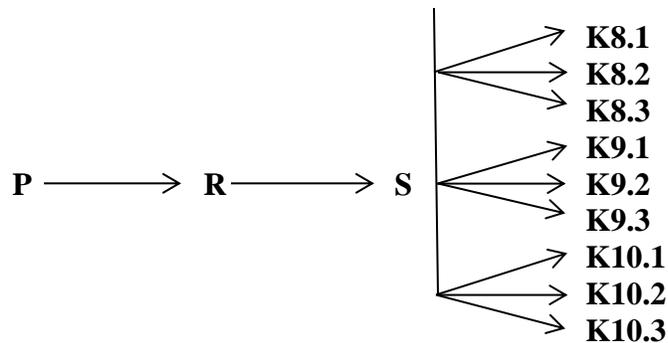
3.1. Jenis dan Rancangan penelitian

3.1.1. Jenis Penelitian

Jenis Penelitian ini adalah penelitian deskriptif kuantitatif dengan design Uji Laboratorium yang dilakukan di laboratorium kimia farmasi. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui analisa kadar antioksidan pada ekstrak kulit jeruk pacitan (*Citrus sinensis*) dengan metode *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH).

3.1.2. Rancangan Penelitian





Gambar 3.1 Design Penelitian Uji Laboratorium

Keterangan :

- P : Populasi
 R : Random
 S : Sampel
 K1.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 12 μg
 K1.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 12 μg pengulangan ke-2 kali
 K1.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 12 μg pengulangan ke-3 kali
 K2.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 24 μg
 K2.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 24 μg pengulangan ke-2 kali
 K2.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 24 μg pengulangan ke-3 kali
 K3.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 48 μg
 K3.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 48 μg pengulangan ke-2 kali
 K3.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 48 μg pengulangan ke-3 kali
 K4.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 72 μg
 K4.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 72 μg pengulangan ke-2 kali
 K4.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 72 μg pengulangan ke-3 kali
 K5.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 96 μg
 K5.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 96 μg pengulangan ke-2 kali
 K5.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 96 μg pengulangan ke-3 kali

- K5.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 120 μg
 K6.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 120 μg pengulangan ke-2 kali
 K6.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 120 μg pengulangan ke-3 kali
 K7.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 144 μg
 K7.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 144 μg pengulangan ke-2 kali
 K7.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 144 μg pengulangan ke-3 kali
 K8.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 168 μg
 K8.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 168 μg pengulangan ke-2 kali
 K8.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 168 μg pengulangan ke-3 kali
 K9.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 192 μg
 K9.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 192 μg pengulangan ke-2 kali
 K9.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 192 μg pengulangan ke-3 kali
 K10.1 : Uji DPPH dengan volume sampel 216 μg
 K10.2 : Uji DPPH dengan volume sampel 216 μg pengulangan ke-2 kali
 K.10.3 : Uji DPPH dengan volume sampel 216 μg pengulangan ke-3 kali

(Untuk mendapatkan % Inhibisi rata – rata, harus dilakukan pengulangan minimal 3x)

3.2. Populasi dan sampel penelitian

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh kulit buah jeruk pacitan (*Citrus sinensis*) yang dijual di Surabaya timur.

3.2.2. Sampel

Dalam penelitian ini sampel yang diperiksa adalah kulit jeruk pacitan (*Citrus sinensis*) yang di ekstrak. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 373 gram sampel bobot kering, dilanjutkan dengan 97 gram ekstrak kental.

Kriteria sampel : sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit jeruk pacitan (*Citrus sinensis*) yang kulitnya dominan berwarna hijau kekuningan pada bagian flavedonya saja.

3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2022 sampai dengan bulan Juli 2023, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Mei 2023 di Laboratorium Kimia Farmasi, Prodi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

3.4 Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah uji aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit jeruk pacitan (*Citrus sinensis*) dengan menggunakan metode *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH)

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Definisi berdasarkan pada karakteristik yang dapat diobservasi dari apapun yang didefinisikan atau mengubah konsep dengan kata-kata yang menguraikan perilaku yang dapat diamati dan dapat diuji serta ditentukan kebenarannya. Adapun operasional variabel tersebut, yaitu:

1. Uji Aktivitas Antioksidan pada ekstrak kulit jeruk pacitan (*Citrus sinensis*) adalah uji yang dilakukan untuk melihat aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH) yang IC50 nya dihitung dari kurva regresi linier dengan memasukkan nilai ke persamaan

$y = a + bx$, termasuk dalam variabel terikat (dependent) menggunakan alat ukur Spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui hasilnya, satuan μg , Skala data interval

3.5 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara sampel kulit jeruk pacitan yang diambil untuk dijadikan ekstrak, kemudian di uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH). menghitung % Inhibisi Rata - rata dan dihitung IC50 nya melalui grafik analisis regresi %. Langkah-langkah pemeriksaannya sebagai berikut :

3.5.1 Instrumen Penelitian atau Metode

Penelitian ini menggunakan metode *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH)

3.5.2 Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : Ember, Nampan, Sikat, Blender, Saringan, Toples, Labu leher tiga, Kondenser, Heating Mantle, Statip, Klem, Sumbat Karet, Alat rotary evaporator, Waterbath, Vial Gelap 10 ml, Botol coklat 200 ml, Beaker Glass 300 ml, Spatula, Kertas Saring, Neraca digital, Vial 30 ml, Labu ukur 100 ml, Labu ukur 10 ml, Labu ukur 5 ml, Mikropipet, tip, Alumunium Foil, Inkubator, Batang Pengaduk, Kaca Arloji, Pipet Tetes, Pipet ukur 5 ml, Sendok Tanduk, Labu Ukur 25 ml, Beaker Glass, Spektrofotometer UV-Vis, Corong Kaca, Push Ball.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi : Air mengalir, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil, Vitamin C, Ethanol 96%, Ethanol Pro Analysis, Ekstrak kulit jeruk pacitan (*Citrus sinensis*).

3.5.3 Prosedur

1. Siapkan alat dan bahan
2. Pembuatan Ekstrak
 - a. Sampel kulit jeruk pacitan dikeringkan dengan oven dengan suhu 70°C selama 2 jam kemudian di haluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk.
 - b. Serbuk ekstrak di timbang dan di masukkan kedalam wadah lalu di tambahkan etanol dengan konsentrasi 96% kemudian dihomogenkan hingga tercampur dan membentuk warna coklat tua.
 - c. Tunggu serbuk ekstrak hingga mengendap dan sari ekstrak kulit jeruk keluar kemudian lakukan dua kali penyaringan untuk mendapatkan hasil sari ekstrak yang tidak tercampur dengan residu.
 - d. Setelah pemisahan sari ekstrak dimasukan kedalam evaporator dengan kecepatan 20 rpm dan diwaterbath dengan suhu 60°C untuk pemisahan dan penguapan etanol dari campuran sari ekstrak kulit jeruk pacitan.
 - e. Setelah etanol terpisah dengan sari ekstrak lalu di tambahkan kembali sari ekstrak yang belum terpisah dan masih tercampur dengan etanol

untuk penguapan kembali hingga etanol menguap dengan maksimal pada semua sari ekstrak tersebut.

- f. Setelah tekstur sari ekstrak agak kental pindahkan kedalam cawan pemanas, jika sari terlalu kental didalam evaporator maka sari tersebut akan menempel dan sulit untuk di keluarkan.
- g. Sari ekstrak yang sudah berada didalam cawan dipanaskan kembali untuk mendapatkan penguapan kedua kalinya hingga tekstur kental maksimal
- h. Tahap selanjutnya ekstrak yang sudah kental di pindahkan kedalam wadah ekstrak kemudian ekstrak pun sudah siap untuk digunakan.

(Rahmawati et al., 2018)

3. Pengujian Antioksidan metode *Diphenylpicrylhidrazyl* (DPPH)

- a. Menyiapkan Alat dan bahan
- b. Menyiapkan larutan *Diphenylpicrylhidrazyl* (DPPH), dengan menimbang 25,4 mg dalam 100 ml metanol PA
- c. Pastikan *Diphenylpicrylhidrazyl* (DPPH) tidak terkena cahaya langsung dengan cara menutup labu ukur dengan alumunium voil,
- d. Menyiapkan sampel uji dengan menimbang sampel ekstrak kulit jeruk pacitan (*Citrus sinensis*) sebanyak 60 mg dalam 25 ml metanol PA.
- e. Menyiapkan 10 sampel uji ekstrak kulit jeruk pacitan yang memiliki variasi konsentrasi dengan memipet 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 60 μ L, 70 μ L, 80 μ L, dan 90 μ L..

- f. Melakukan pengenceran menggunakan pelarut Metanol PA hingga 100 μg .
 - g. Menambahkan larutan *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH) sebanyak 100 μg pada masing masing konsentrasi.
 - h. Menyiapkan larutan kontrol yang berisi 100 μg metanol PA dan 100 μg larutan *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH).
 - i. Inkubasi larutan selama 30 menit pada suhu ruang sehingga terjadi perubahan warna dari aktivitas *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH)
 - j. Semua sampel di buat triplo (3 kali pengulangan)
 - k. Sampel ekstrak yang telah di inkubasi di uji nilai absorbansinya menggunakan spktrofotometer Uv-vis pada panjang gelombang 517 nm.

(Sesuai Dengan Standart Operasional Prosedur (SOP) Laboratorium Kimia Farmasi Prodi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala)
4. Pembuatan Larutan Vitamin C sebagai pembanding
 - a. Menyiapkan alat dan bahan
 - b. Menyiapkan serbuk Vitamin C, dengan menimbang serbuk Vitamin C sebanyak 22 mg dalam 25 ml metanol PA
 - c. Menyiapkan 10 variasi konsentrasi Vitamin C sebagai pembanding dengan memipet 5 μL , 10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL , 50 μL , 60 μL , 70 μL , 80 μL , dan 90 μL .
 - d. Melakukan pengenceran menggunakan pelarut Metanol PA hingga

100 µg.

- e. Menambahkan larutan *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH) sebanyak 100 µg pada masing masing konsentrasi.
- f. Menyiapkan larutan kontrol yang berisi 100 µg metanol PA dan 100 µg larutan *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH).
- g. Inkubasi larutan selama 30 menit pada suhu ruang sehingga terjadi perubahan warna dari aktivitas *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH)
- h. Semua sampel di buat triplo (3 kali pengulangan)
- i. Larutan pembanding Vitamin C di inkubasi dan di uji nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-vis pada panjang gelombang 517 nm.

(Sesuai Dengan Standart Operasional Prosedur (SOP) Laboratorium Kimia Farmasi Prodi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala)

5. Penentuan nilai IC50

Perhitung nilai IC50 diperlukan data persen inhibisi dari pengujian yang dilakukan. Persen inhibisi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbans Kontrol} - \text{Absorbans Uji}}{\text{Absorbans Kontrol}} \times 100\%$$

Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan IC50 dari masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC50. Suatu senyawa memiliki antioksidan yang

sangat kuat bila nilai IC50 < 50 µg/mL, kuat bila nilai IC50 bernilai 50-100 µg/mL, sedangkan sedang apabila nilai IC50 bernilai 100-150 µg/mL, dan lemah bila nilai IC50 bernilai 151 - 200 µg/mL

3.5.4 Tabulasi Data

Tabel 3.1 Contoh tabulasi data hasil pemeriksaan Uji Aktivitas Antioksidan

No	Volume	Pengulangan			Nilai IC50	Keterangan
		1	2	3		
1						
2						
Dst						
10						
Jumlah	10 Sampel dengan perbedaan konsentrasi, 3x Pengulangan					

3.6 Teknik Analisa Data

Analisis data yang diperoleh dari hasil penelitian ini di tabulasikan dengan cara mendeskripsikan data-data yang diperoleh dalam bentuk tabel dan grafik persamaan regresi linier dengan mengganti nilai y menjadi 50 dari rumus $y = a + bx$ untuk mengetahui perbandingan aktifitas antioksidan pada ekstrak kulit jeruk pacitan (*Citrus sinensis*) dengan Vitamin C (senyawa murni) sebagai pembanding.

3.7 Keterbatasan Penelitian

- a. Pada penelitian ini penulis berkolaborasi dengan peneliti lainnya sehingga tidak menghitung sampel kering yang dibutuhkan khusus untuk penelitian ini.