

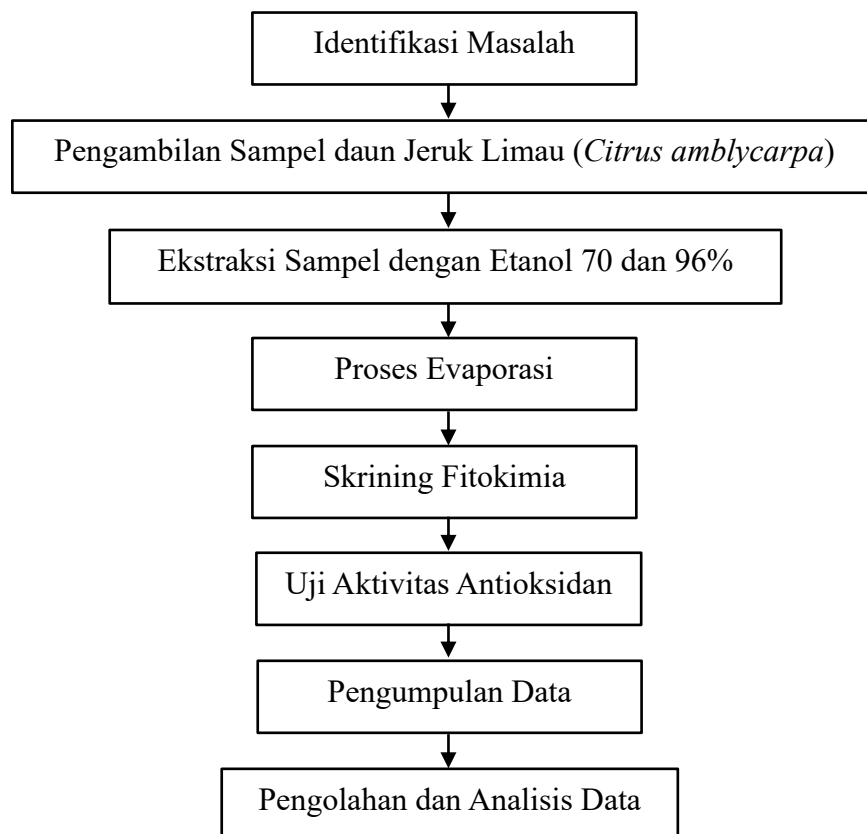
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental metode kuantitatif. Penelitian eksperimental merupakan penelitian yang dilakukan dalam kondisi terkendali, dimana memiliki tujuan untuk melihat adanya pengaruh yang timbul antara variabel bebas terhadap variabel terikat sebagai akibat dari adanya sebuah perlakuan (Sugiyono, 2024).

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Bagan Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Sampel daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*) berasal dari Desa Lalang Linggah, Kecamatan Selemadeg Barat, Kabupaten Tabanan, Bali. Pemeriksaan skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober Tahun 2024 sampai dengan bulan April Tahun 2025.

D. Populasi dan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*) yang diambil dari Desa Lalang Linggah, Kecamatan Selemadeg Barat, Kabupaten Tabanan, Bali.

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini yaitu nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI) ekstrak daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*) pada konsentrasi etanol 70 dan 96%.

2. Besar sampel

Pada penelitian ini digunakan sebanyak 3 kg bahan mentah daun jeruk limau. Sampel daun jeruk limau diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 70 dan 96%, sehingga didapatkan ekstrak kental daun jeruk limau dan diuji kadar aktivitas antioksidannya. Sehingga pada penelitian ini terdapat 2 kelompok perlakuan yaitu ekstrak daun jeruk limau pada etanol 70%, ekstrak

daun jeruk limau pada etanol 96%. Pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan pengujian yang ditentukan dengan menggunakan rumus *Federer* yaitu: (Hanafiah, 2022)

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

Keterangan:

t : jumlah perlakuan

r : jumlah pengulangan

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(2 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$1(r - 1) \geq 15$$

$$r - 1 \geq 16$$

$$r \geq 16$$

Berdasarkan perhitungan diatas, pengulangan yang dilakukan untuk setiap kelompok perlakuan adalah sebanyak 16 kali. Sehingga besar sampel adalah sebanyak 32 sampel.

3. Teknik pengambilan sampel

Pengambilan sampel menggunakan teknik *Purposive Sampling*, dimana sampel diambil sesuai dengan kriteria yang sudah ditentukan. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*) yang diperoleh dari Desa Lalang Linggah, Kecamatan Selemadeg Barat, Kabupaten Tabanan, Bali. Sampel diambil pada pagi hari dengan bahan baku segar sebanyak 3 kg.

- a. Kriteria inklusi dari daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*) yang digunakan adalah daun segar yang diambil pada helai daun keempat

hingga kedelapan dari pucuk tangkai tanaman, daun berwarna hijau tua, serta tidak berlubang.

- b. Kriteria eksklusi dari daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*) yaitu daun yang layu, berlubang, terdapat jamur dan memiliki warna kekuningan.

4. Alat dan bahan

- a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu: pipet volume, timbangan duduk, blender, tabung reaksi dan raknya, erlenmeyer, gunting, corong, toples, satu set *Rotary Evaporator*, batang pengaduk, pipet ukur, labu ukur, beaker glass, ball pipet, neraca analitik, gelas ukur, ayakan 50 mesh, serta alat Spektrofotometri UV-Vis.

- b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*), etanol 70%, etanol 96%, methanol, kloroform, aluminium foil, kertas saring, aquadest, asam sulfat (H₂SO₄) pekat, reagen Dragendorff, reagen Mayer, serbuk magnesium (Mg), asam klorida (HCl) pekat, asam asetat anhidrat, besi (III) klorida (FeCl₃) 5%, serbuk DPPH (2,2-*diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

5. Prosedur kerja

- a. Tahapan pra-analitik

- 1) Pengambilan dan pembuatan serbuk simplisia (Handoyo dan Pranoto, 2020)
- a) Sampel daun jeruk limau segar diambil sebanyak 3 kg pada pagi hari sesuai kriteria inklusi.

- b) Selanjutnya sampel daun disortasi basah dan dicuci dengan menggunakan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang melekat pada daun.
- c) Daun dirajang menjadi bagian kecil-kecil untuk memudahkan proses pengeringan dan dilakukan penimbangan berat basah bahan.
- d) Daun diletakkan pada wadah bersih dan dikeringkan dengan teknik pengeringan diangin-anginkan selama 14 hari.
- e) Setelah kering daun jeruk limau disortasi kembali untuk memisahkan sampel dari pengotor yang ikut tercampur selama proses pengeringan, kemudian daun dihaluskan menggunakan blender.
- f) Setelah daun halus, kemudian diayak menggunakan ayakan no.50 mesh dan dilakukan penimbangan sebagai berat keringnya (Widayanti dkk., 2023).

2) Proses ekstraksi

- a) Simplisia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70 % dan 96 % dengan perbandingan 1:4 (Islamiyati dkk., 2024).
- b) Maserasi dilakukan selama 7 hari dengan dilakukan remaserasi kembali pada residu ekstrak sebanyak 2 kali.
- c) Selanjutnya ekstrak yang didapatkan dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* 45-60⁰C dan pada waterbath dengan suhu 50⁰C hingga didapatkan ekstrak kental daun jeruk limau (Harahap dkk., 2022).
- d) Ekstrak kental kemudian dihitung nilai % rendemen, nilai rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus berikut: (Agustien, 2021)

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

b. Tahapan analitik

1) Skrining fitokimia

Uji skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan dua sampel ekstrak bahan alam yaitu ekstrak etanol 70 dan 96% daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*). Prosedur pengujian skrining fitokimia dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

a) Preparasi sampel

- (1) Ditimbang masing-masing 10 g sampel ekstrak kental daun jeruk limau.
- (2) Ditambahkan sebanyak 250 mL pelarut etanol dengan konsentrasi yang sesuai pada proses ekstraksi.
- (3) Dilakukan proses penyaringan pada ekstrak etanol 70 dan 96% daun jeruk limau dan filtrat yang didapatkan diuji kandungan fitokimia.

b) Uji flavonoid (Ayun dan Laily, 2018)

- (1) Dipipet sebanyak 1 mL sampel filtrat sampel daun jeruk limau.
- (2) Ditambahkan sebanyak 4 mL etanol dan dilakukan pemanasan selama 5 menit.
- (3) Ditambahkan dengan beberapa tetes reagen HCl pekat dan ditambahkan 0,2 g bubuk Magnesium. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah tua.

c) Uji alkaloid (Cahyani dkk., 2019)

- (1) Dipipet sebanyak 3 mL filtrat sampel daun jeruk limau.
- (2) Ditambahkan sebanyak 5 tetes reagen HCl 2N, selanjutnya larutan dibagi menjadi 2 dan masing-masing dipipet sebanyak 1,5 mL pada tabung reaksi.
- (3) Ditambahkan reagen Dragendorff sebanyak 3 tetes pada tabung pertama, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan jingga.

(4) Ditambahkan sebanyak 3 tetes reagen Mayer, hasil positif ditandai terbentuknya endapan putih atau kuning.

d) Uji terpenoid (Harahap dkk., 2022)

(1) dipipet sebanyak 1 mL filtrat sampel daun jeruk limau.

(2) Ditambahkan sebanyak 2 mL kloroform.

(3) Ditambahkan sebanyak 10 tetes asam asetat anhidrat.

(4) Ditambahkan sebanyak 1 – 2 mL H_2SO_4 pekat melewati dinding tabung.

Hasil positif ditandai dengan terbentuknya berwarna hijau kebiruan.

e) Uji saponin (Pangondian dkk., 2022)

(1) Dipipet sebanyak 1 ml filtrat sampel daun jeruk limau.

(2) Ditambahkan dengan 10 mL aquadest yang dipanaskan.

(3) Tabung tersebut dikocok kuat-kuat selama 30 detik. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa yang konsisten selama beberapa menit dan busa masih terbentuk pada penambahan 1 tetes HCl 2N.

f) Uji tanin (Pangondian dkk., 2022)

(1) Dipipet sebanyak 1 ml filtrat sampel daun jeruk limau.

(2) Ditambahkan reagen FeCl_3 5 % sebanyak 2-3 tetes.

(3) Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan pada larutan.

g) Pengujian larutan blanko

(1) Dipipet sebanyak 1 mL pelarut etanol dengan konsentrasi yang sesuai pada ekstrak.

(2) Dilakukan uji fitokimia yaitu uji flavonoid, uji alkaloid, uji terpenoid, uji saponin dan uji tanin. Larutan blanko digunakan sebagai kontrol negatif pemeriksaan.

2) Uji aktivitas antioksidan

Setelah dilakukan uji skrining fitokimia, maka dilanjutkan dengan melakukan pengujian aktivitas antioksidan pada dua sampel yaitu ekstrak etanol 70 dan 96% daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*). Langkah-langkah uji aktivitas antioksidan adalah sebagai berikut:

a) Penentuan panjang gelombang maksimum (Rosa, 2023)

- (1) Dipipet sebanyak 2 mL larutan DPPH pada tabung reaksi.
- (2) Ditambahkan 2 mL metanol p.a dan homogenkan.
- (3) Larutan diinkubasi pada ruang gelap selama 30 menit.
- (4) Dilakukan pengukuran pada spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm.

b) Pembuatan larutan DPPH (Pratiwi dkk., 2023)

- (1) Ditimbang DPPH sebanyak 4 mg dan dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL.
- (2) Ditambahkan pelarut metanol p.a hingga tanda batas labu ukur, sehingga didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 40 ppm.
- (3) Larutan DPPH dimasukkan kedalam botol gelap dan ditutup menggunakan aluminium foil, simpan pada ruangan gelap.

c) Pembuatan larutan stok ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm (Oktaviana dkk., 2023).

- (1) Ditimbang sebanyak 100 mg ekstrak kental daun jeruk limau.

- (2) Dilarutkan dengan menambahkan larutan methanol p.a pada labu ukur 100 mL (hingga tanda batas labu ukur).
- d) Pembuatan seri konsentrasi sampel daun jeruk limau (25, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm) (Oktaviana dkk., 2023)
 - (1) Dipipet masing-masing ekstrak pada larutan induk sebanyak 250, 500, 750, 1000, 1250 dan 1500 µl pada labu ukur 10 mL.
 - (2) Ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas labu ukur sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 25, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm. Dilakukan pengulangan sebanyak 16 kali pada masing-masing ekstrak daun jeruk limau dengan konsentersasi etanol 70 % dan 96 %.
- e) Pengujian aktivitas antioksidan (Oktaviana dkk., 2023)
 - (1) Dipipet masing-masing konsentrasi 25, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm sebanyak 2 mL pada tabung reaksi.
 - (2) Ditambahkan sebanyak 2 mL larutan DPPH.
 - (3) Larutan tersebut diinkubasi pada ruangan gelap selama 30 menit.
 - (4) Diukur absorbansi dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (517 nm), masing - masing konsentrasi dilakukan pengulangan pengukuran sebanyak 3 kali.
- f) Pengukuran absorbansi blanko (Kiromah dkk., 2021)
 - (1) Dipipet sebanyak 2 mL larutan DPPH dan dimasukkan kedalam tabung reaksi.
 - (2) Ditambahkan sebanyak 2 mL methanol p.a dan inkubasi pada ruangan gelap selama 30 menit.

- (3) Diukur absorbansi larutan blanko pada alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

c. Tahapan post-analitik

- a) Perhitungan persen inhibisi (Rosa, 2023)

- (1) Persen inhibisi sampel diukur dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100$$

Keterangan:

Abs. Kontrol : serapan radikal DPPH

Abs. Sampel : serapan konsentrasi sampel ekstrak

- b) Penentuan nilai IC_{50} (Kiromah dkk., 2021)

- (1) Penentuan nilai IC_{50} dilakukan dengan menggunakan rumus regresi linier dengan persamaan $Y = bx + a$.

- (2) Konsentrasi sampel (ppm) dimasukkan sebagai absis sumbu x dan nilai % inhibisi ekstrak sebagai absis sumbu y. Sehingga didapatkan nilai a dan b pada persamaan $Y = bx + a$.

- (3) Selanjutnya nilai Y pada persamaan disubstitusikan menjadi 50, sehingga nilai x dapat diketahui. Nilai x dinyatakan sebagai konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % radikal bebas.

- c) Penentuan nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI)

- (1) Aktivitas antioksidan pada ekstrak daun jeruk limau dihitung dengan menggunakan parameter *Antioxidant Activity Index* (AAI). Adapun rumus perhitungan AAI adalah sebagai berikut: (Abbas dan Nurhalisa, 2021).

$$AAI = \frac{\text{Konsentrasi DPPH (ppm)}}{IC_{50} \text{ (ppm)}}$$

Tabel 3
Interpretasi Nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI)

Nilai AAI (ppm)	Kategori
<0,5	Antioksidan lemah
0,5-1,0	Antioksidan sedang
>1,0-2,0	Antioksidan kuat
>2,0	Antioksidan sangat kuat

Sumber: (Segara dan Kurniawan, 2023)

- d) Pengolahan limbah (Brawijaya, 2016)
- (1) Gunakan alat pelindung diri yaitu masker, sarung tangan medis dan jas laboratorium.
 - (2) Limbah cair berupa pelarut organik, bahan kimia hasil penelitian ditampung pada jerigen khusus limbah dan ditutup rapat untuk mencegah kebocoran dan tumpahan limbah cair.
 - (3) Limbah yang bersifat asam dinetralkan dengan basa seperti: CaO, sebaliknya limbah yang bersifat basa dinetralkan dengan asam seperti: H₂SO₄ atau HCl.
 - (4) Air sisa pencucian alat-alat laboratorium (erlenmeyer, beaker glass, pipet volume, pipet ukur, labu ukur, tabung reaksi) dapat langsung dibuang kedalam bak saluran air dengan cara dialiri air.
 - (5) Pembuangan limbah bahan kimia cair diencerkan terlebih dahulu sampai pH netral yaitu berkisar pH 7.

- (6) Limbah organik yaitu tumbuhan sisa kegiatan penelitian dikumpulkan dan dibuang ke tempat pembuangan sampah.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer merupakan data yang diperoleh secara langsung dengan melakukan penelitian pada objek yang diteliti (Sugiyono, 2024). Data primer diperoleh dari hasil penelitian terhadap uji kualitatif dan kuantitatif terkait penelitian terhadap kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidan pada daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*).

b. Data sekunder

Data sekunder adalah merupakan data yang bersumber dari penelitian orang lain (Sugiyono, 2024). Data sekunder yang digunakan berupa jurnal penelitian, laporan dinas kesehatan dan riset kesehatan.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik observasi dan pemeriksaan laboratorium. Observasi merupakan teknik pengumpulan data berdasarkan dilakukannya pengamatan terhadap subjek/objek yang diteliti dan disertai dengan pencatatan. Observasi yang dilakukan yaitu observasi terstruktur, dimana penelitian dirancang secara sistematis sehingga peneliti mengetahui dengan pasti proses pengamatan variabel yang diteliti (Sugiyono, 2024). Sedangkan pemeriksaan laboratorium memberikan data mengenai hasil uji fitokimia dan uji aktivitas antioksidan pada ekstrak daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*).

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen pengumpulan data mengacu kepada alat yang digunakan untuk membantu proses penelitian. Dalam konteks ini terdapat hubungan erat terkait pendekatan penelitian dengan alat pengukuran yang digunakan. Proses penelitian bergantung pada pemilihan instrument pengumpulan data yang tepat, karena hal tersebut dapat mempengaruhi hasil penelitian secara keseluruhan. Instrumen pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Alat tulis.
- b. Kamera.
- c. Alat untuk uji skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Dalam penelitian ini peneliti menggunakan teknik pengolahan data deskriptif, dimana data hasil penelitian yang didapatkan dikumpulkan, dicatat, diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan narasi. Pengolahan data pada uji skrining fitokimia menggunakan analisis deskriptif untuk menguraikan kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin dan tanin pada ekstrak daun jeruk limau. Sedangkan data pengujian aktivitas antioksidan dianalisis secara kuantitatif yang diperoleh berdasarkan hasil perhitungan dilapangan dan disajikan dalam bentuk numerik.

2. Analisis data

Analisis data penelitian yang dilakukan berupa analisis statistik dengan menggunakan program aplikasi SPSS. Analisis data meliputi uji normalitas data dan uji hipotesis. Uji normalitas data adalah uji statistik yang bertujuan untuk

mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas data yang digunakan adalah uji *Shapiro-Wilk*, hal ini dikarenakan data yang digunakan berjumlah <50 . Pengambilan kesimpulan didasarkan pada nilai signifikansi, apabila nilai signifikansi (*Sig.*) $> 0,05$, maka dapat disimpulkan data berdistribusi normal. Sedangkan data berdistribusi tidak normal apabila nilai signifikansi (*Sig.*) $< 0,05$. Apabila data berdistribusi normal, maka uji hipotesis menggunakan uji *Independent Sample T Test*, uji ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh konsentrasi pelarut etanol 70 % dan 96 % terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*). Sedangkan apabila data tidak berdistribusi normal maka dilakukan uji *Mann Whitney*. Pengambilan keputusan berdasarkan nilai signifikansi yang didapat, apabila nilai signifikansi (*Sig.*) $< 0,05$ maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan pada kedua kelompok data. Sedangkan apabila nilai signifikansi (*Sig.*) $> 0,05$ maka dapat disimpulkan tidak terdapat perbedaan pada kedua kelompok data.

G. Etika Penelitian

Etika dapat diartikan sebagai kumpulan nilai yang menekankan pentingnya hak dan kewajiban terhadap moral sebagai panduan dalam kehidupan manusia. Etika penelitian merupakan standar aturan yang harus dipatuhi oleh peneliti selama menjalankan penelitian, hal ini mencakup hubungan peneliti dengan subjek penelitiannya serta dampak yang dihasilkan penelitian tersebut bagi masyarakat (Putra dkk., 2021). Pada penelitian ini, etika penelitian yang diterapkan berdasarkan pada prinsip *Beneficience and Non Maleficience* yaitu prinsip yang menekankan pada setiap tindakan dapat

menghasilkan manfaat yang optimal bagi masyarakat dengan risiko yang seminimal mungkin. Penulis menerapkan kode etik yaitu kejujuran, bertanggung jawab, melahirkan karya orisinil serta tulisan yang ditulis secara cermat, teliti dan tepat (Haryani dan Setyobroto, 2022).