

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi etanol sebagai pelarut terhadap aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill.). Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode ultrasonikasi dengan pelarut etanol berbeda, yaitu konsentrasi 50%, 70%, dan 96% dengan perbandingan 1:10 (b/v). Proses ekstraksi dilakukan sekitar 45 menit pada suhu 45⁰C. Larutan yang sudah di ekstraksi disaring menggunakan kertas saring *whatman* no 1. Ekstrak cair yang telah diperoleh kemudian dikentalkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 45⁰C untuk memperoleh ekstrak kental. Pengujian ekstrak pada penelitian ini, dilakukan uji secara kualitatif berupa uji organoleptik, uji penapisan fitokimia, dan uji KLT. Selanjutnya, dilakukan uji secara kuantitatif berupa uji penangkalan radikal bebas dengan menggunakan metode DPPH dan menghitung nilai IC₅₀ dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada λ max.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biofarmakologi Prodi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Mei-Juli tahun 2023.

C. Populasi dan Sampel Daun Alpukat

1. Populasi

Daun alpukat dipetik dari perkebunan buah alpukat yang ada di Kecamatan Purwosari, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta sebanyak \pm 1 kg untuk memperoleh sampel kering sebanyak 60 gram.

2. Sampel

Daun yang dibutuhkan dalam penelitian ini ialah daun dengan kriteria berupa daun tua, berwarna hijau tua, permukaan daun halus, diambil di bawah daun muda sekitar 1 meter dari pucuk.

D. Variabel Penelitian

1. Variable utama

- a. Variabel bebas : Variasi konsentrasi etanol 50%, 70%, dan 96%.
- b. Variabel terikat : Nilai antioksidan berupa IC_{50} pada sampel daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

2. Variabel pengacau

- a. Variable terkendali : Variable terkendali dalam penelitian ini, yaitu bobot daun yang digunakan, tempat tumbuh pohon alpukat, waktu daun dipetik, dan suhu serta waktu yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun alpukat.
- b. Variabel tak terkendali : Variable tak terkendali dalam penelitian ini, yaitu temperatur (suhu) serta cuaca lingkungan.

E. Definisi Operasional

1. Aktivitas antioksidan: Kemampuan suatu konsentrasi pelarut sampel daun alpukat untuk mengikat senyawa zat asing (radikal bebas).
2. *Inhibitory Concentration* 50 (IC_{50}): Konsentrasi sampel daun alpukat yang mampu menghambat 50% radikal bebas.
3. Ekstrak kental: Sediaan kental yang memiliki konsentrasi lebih tinggi daripada ekstrak biasa, yang dihasilkan dengan mengurangi jumlah pelarut dalam ekstrak tersebut, sehingga meningkatkan konsentrasi senyawa-senyawa aktif yang ada di dalamnya.
4. Etanol 50%: Larutan yang terdiri dari 50% etanol dan 50% air.
5. Etanol 70%: Larutan yang terdiri dari 70% etanol dan 30% air.
6. Etanol 96%: Larutan yang terdiri dari 96% etanol dan 4% air.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang perlu dipersiapkan dalam penelitian ini, yaitu ayakan 40 mesh, grinder simplisia (*fomac*), *hotplate* (IKA C-MAG HS 7), *Chamber* KLT, kertas saring, kertas saring *Whatman* no 1, lampu UV, oven, seperangkat alat gelas, spektrofotometer *double beam* (*thermo scientific genesis* 10S), software *SPSS*, termometer, timbangan analitik (*ohaus*), *ultrasonic bath* (*cole-parmer*), *waterbath* (*memmert*), dan vortex (*dlab mx-s*).

2. Bahan

Bahan yang harus dipersiapkan, berupa aquades, daun alpukat, DPPH (*2,2-diphenyl-1-pikrihidrazyl*), etanol (pro analisis), etanol dengan konsentrasi 50% (teknis); 70% (teknis), fase gerak (kloroform : metanol : air), plat *silica gel* 60 F₂₅₄, HCl pekat (pro analisis), kuersetin (pro analisis), pereaksi FeCl₃ 10% (reagen), pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, serbuk magnesium (teknis)

G. Metode Pengumpulan Data

1. Pengambilan dan Determinasi Daun Alpukat

Daun alpukat yang digunakan berasal dari perkebunan buah alpukat di Kecamatan Purwosari, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta yang dipetik pada pukul 06.00-07.00 WIB. Pemetikan daun alpukat tersebut dilakukan pada bulan Mei 2023, saat usia tanaman lebih dari 3 tahun, dengan kriteria daun tua seperti warna daun hijau tua, permukaan daun halus, diambil di bawah daun muda sekitar 1 m dari pucuk. Setelah itu, tanaman tersebut di determinasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Penyiapan Simplisia

Preparasi sampel dilakukan dengan cara daun alpukat disortir terlebih dahulu dan dicuci bersih dengan tujuan untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian terhindar dari kontaminan. Dikeringkan daun yang sudah dipilih dengan tujuan untuk menyusutkan kadar air yang terdapat dalam sampel. Pengeringan sampel menggunakan oven dalam suhu 40°C sampai

menunjukkan identifikasi kering, seperti pada saat diremas akan hancur. Digunakan suhu 40°C dikarenakan suhu yang tinggi dapat merusak senyawa flavonoid (Syafriada *et al.*, 2018). Sampel yang sudah dikeringkan kemudian dimasukkan ke dalam grinder untuk diserbuk dan diayak dengan menggunakan ayakan 40 mesh yang bertujuan untuk mempermudah ekstraksi. Setelah itu diperoleh bubuk simplisia.

3. Pembuatan Ekstrak Etanol

Sebanyak 20 g sampel daun alpukat dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan pelarut dengan konsentrasi masing-masing (50%, 70%, dan 96%) sebanyak 200 mL (1:10 b/v), kemudian diekstraksi menggunakan *ultrasonic bath* dengan suhu 45°C selama 45 menit. Selanjutnya, larutan disaring menggunakan kertas saring *whatman* no 1. Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu 45°C (Savitri *et al.*, 2017). Setelah didapatkan ekstrak kental, kemudian dihitung rendemennya dengan persamaan (1):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat serbuk}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

4. Uji Organoleptis

Proses pengujian organoleptis untuk mengetahui sifat fisik sampel yang meliputi warna, aroma/bau, dan rasa, kemudian hasilnya dideskripsikan secara kualitatif.

5. Uji Penapisan Fitokimia

Pada analisis penapisan fitokimia ini, uji yang dilakukan, berupa analisis alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

a. Alkaloid

1) Uji Mayer

Diambil EDA dari masing-masing konsentrasi sebanyak 40 mg dan dicampurkan beberapa tetes HCl 1%, setelah larut dicampurkan 1 mL pereaksi Mayer. Bila terjadi penggumpalan endapan atau warna larutan

berubah keruh, maka dapat dikatakan bahwa reaksi positif adanya alkaloid.

2) Uji Wagner

Diambil EDA dari masing-masing konsentrasi sebanyak 0,01 mg dan dicampurkan 0,5 mL HCl 2%, setelah larut dicampurkan 2-3 tetes pereaksi Wagner. Bila terjadi penggumpalan endapan berwarna coklat, maka dapat dikatakan bahwa reaksi positif adanya alkaloid (Kopon *et al.*, 2020).

b. Flavonoid

Diambil EDA dari masing-masing konsentrasi sebanyak 40 mg ditambahkan 100 mL air panas dan dididihkan sekitar 5 menit setelah itu disaring. Filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 5 mL kemudian dicampurkan 0,05 mg serbuk magnesium dan 1 mL HCl pekat, lalu gojog kuat. Bila terjadi perubahan warna larutan menjadi merah, kuning atau jingga, maka dapat disimpulkan bahwa larutan positif mengandung flavonoid.

c. Saponin

Diambil EDA dari masing-masing konsentrasi sebanyak 40 mg dicampurkan dengan 10 mL air, kemudian digojog sekitar 60 detik, dan ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Bila buih yang terbentuk tetap stabil sekitar 7 menit, maka dapat dikatakan ekstrak positif mengandung saponin.

d. Tanin

Diambil EDA dari masing-masing konsentrasi sebanyak 40 mg dicampurkan dengan 4 mL air, kemudian EDA yang telah larut diambil 2 mL dan ditambahkan 1 mL FeCl_3 10%. Bila ekstrak membentuk warna biru tua atau hitam kehijauan, maka dapat dikatakan ekstrak tersebut positif mengandung tanin.

6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Penjenuhan bejana kromatografi

Penjenuhan bejana bertujuan untuk menyelaraskan tekanan uap dari fase gerak yang digunakan sehingga proses pemisahan dapat berjalan dengan efektif (Dewi *et al.*, 2018). Penjenuhan bejana dilakukan dengan cara meletakkan kertas saring berukuran 10 cm ke dalam bejana yang berisi fase gerak dan ditutup kedap. Fase gerak yang digunakan, yaitu campuran kloroform : metanol : air (Kemenkes RI, 2017).

b. Optimasi Penggunaan Berbagai Macam Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan pada penelitian:

- 1) Kloroform : Metanol : Air (9,6:1,44:0,96)
- 2) Kloroform : Metanol : Air (8:1,2:0,8)

c. Pembuatan larutan uji

Larutan uji yang digunakan dalam penelitian ini merupakan larutan uji dengan konsentrasi 10%, dengan pengambilan EDA sebanyak 1 g dan dicampur dengan 10 mL etanol p.a, kemudian disonikator selama 3 menit pada suhu 30⁰ C (Kemenkes RI, 2017). Pembanding yang digunakan merupakan pembanding berupa kuersetin dengan konsentrasi 0,1% dengan cara ditimbang sebanyak 10 mg kuersetin dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a (Zulkarnaen *et al.*, 2016).

d. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis

Pengujian flavonoid dengan metode KLT ini, digunakan fase diam berupa *silica gel* 60 F₂₅₄. Langkah pertama, plat KLT dioven terlebih dahulu pada suhu 100⁰C selama 45 menit. Setelah itu, plat KLT ditotolkan 3-5 spot filtrat etanol daun alpukat dan baku pembanding (kuersetin), kemudian plat KLT diletakkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan menggunakan fase gerak dan ditutup serta dibiarkan hingga eluen naik. Setelah itu, diamati noda pada plat KLT dengan sinar tampak pada UV 254 nm dan 366 nm. (Sopianti & Sulasmi, 2020). Pengukuran bercak menggunakan persamaan (2):

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solute}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}} \dots\dots\dots (2)$$

Ket. (*Rf*) *Retention Factor* merupakan sebuah nilai yang didapat berdasarkan posisi bercak.

7. Uji Peredaman Radikal Bebas DPPH

Pada uji peredaman radikal bebas DPPH ini, dilakukan beberapa tahap sebelum pembacaan nilai absorbansi DPPH dan perhitungan nilai IC₅₀, yang dilakukan dengan tahap:

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Disiapkan serbuk DPPH (*2,2-diphenyl-1-pikrihidrazil*) sebanyak 4 mg dan dicampurkan etanol p.a menggunakan labu takar 100 mL (40 ppm) (Fauzi & Santoso, 2021).

b. Pembuatan Larutan Stok Kuersetin

Pembanding kuersetin ditimbang sebanyak 10 mg dicampurkan dengan etanol p.a dalam labu takar 100 mL, sehingga didapatkan larutan induk 100 ppm. Kemudian dibuat seri konsentrasi 1 ppm; 1,5 ppm; 2 ppm; 2,5 ppm; dan 3 ppm dengan 3 kali pengulangan (Suyatmi *et al.*, 2019).

c. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol 50%, 70%, dan 96%

Sebanyak 25 mg EDA dari masing-masing konsentrasi dilarutkan dalam labu takar 50 mL dengan menggunakan etanol p.a sehingga diperoleh larutan baku 500 ppm. Selanjutnya, dibuat seri konsentrasi dari larutan induk dengan variasi konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm (pengulangan 3 kali). Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 515 nm yang telah diperoleh (Riskianto *et al.*, 2021).

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH dan *Operating Time*

Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH ialah untuk menentukan λ mana DPPH menyerap cahaya dengan intensitas tertinggi. Panjang gelombang ditentukan dengan cara diambil sebanyak 3 mL larutan DPPH yang telah dibuat, kemudian di *scanning* menggunakan

spektrofotometer pada panjang gelombang 400-800 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimum beserta dengan nilai absorbansi DPPH (kontrol).

Operating time bertujuan untuk mengetahui waktu optimum reaksi antara baku pembanding dengan larutan uji DPPH yang diberikan. Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara, mereaksikan baku pembanding kuersetin dengan DPPH, dengan cara diambil 2 mL larutan pembanding kuersetin dan dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH. Serapan dibaca pada λ maksimum 515 nm yang telah diperoleh dalam *time range* 0-60 menit (interval 1 menit) sampai dihasilkan serapan yang stabil.

e. Pembacaan Nilai Absorbansi dengan Spektrofotometri Uv-Vis

Larutan uji dengan konsentrasi masing-masing serta larutan pembanding dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL dalam tabung yang berbeda. Tambahkan 1 mL DPPH dan di vortex, kemudian diinkubasi selama *operating time*. Serapan diukur menggunakan spektrofotometri *visible* pada λ maksimum 515 nm yang telah didapatkan pada penentuan panjang gelombang maksimum (Suyatmi *et al.*, 2019).

H. Metode Analisis dan Pengolahan Data

1. Penentuan Nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Nilai IC₅₀ biasa dinyatakan sebagai persen inhibisi (% *Inhibisi*) dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (3):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

Keterangan :

Absorbansi kontrol = Serapan DPPH

Absorbansi sampel = Serapan DPPH + sampel

Setelah diperoleh (% *inhibisi*) dari tiap konsentrasi, dilakukan perhitungan menggunakan persamaan regresi linear antara konsentrasi dengan % *inhibisi* dengan persamaan $y = bx + a$ (Abdullah *et al.*, 2014).

Keterangan:

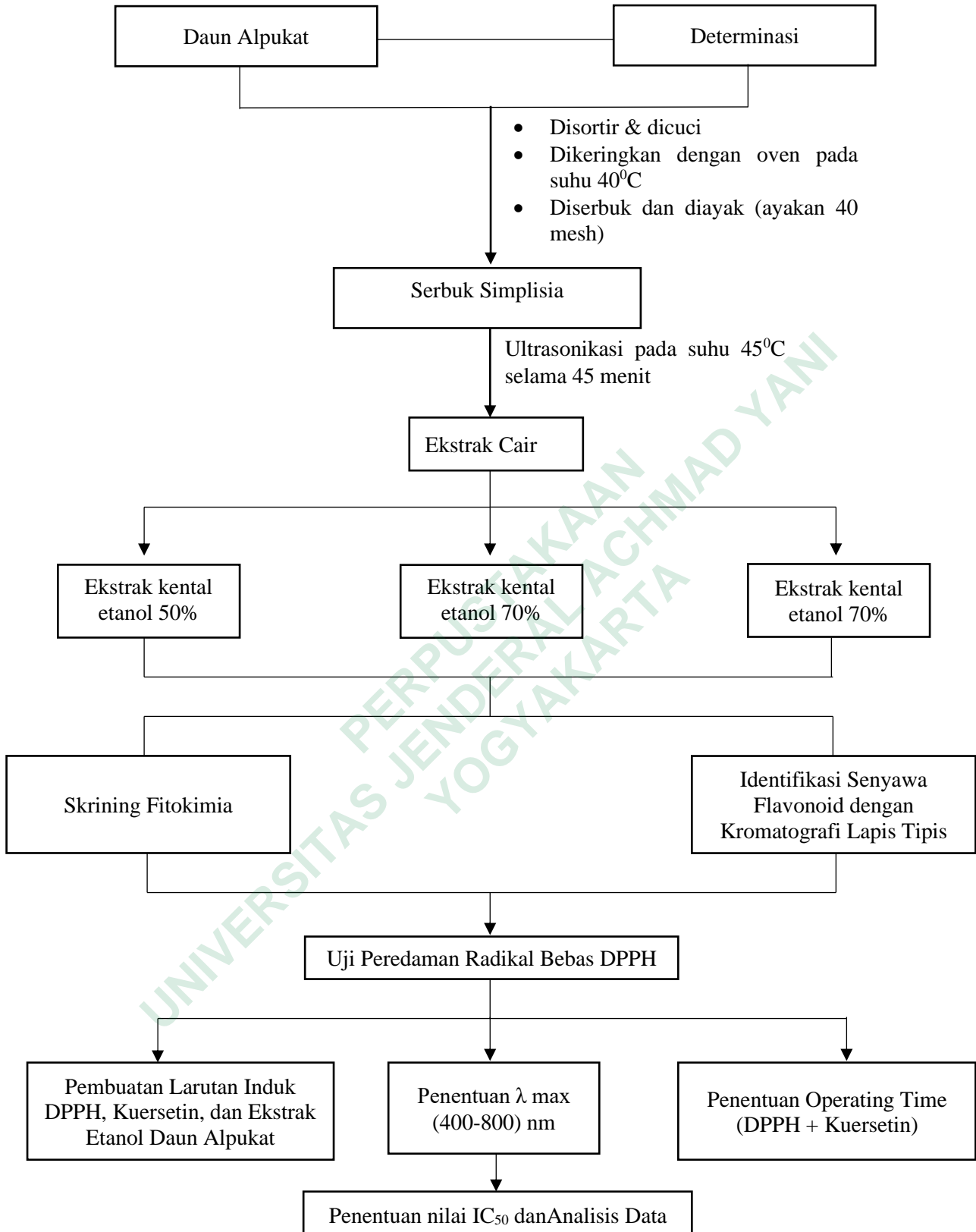
y : 50

a : Titik perpotongan antara suatu garis dengan sumbu Y pada diagram (*Intercept*)

b : Kemiringan (*slope*)

2. Uji ANOVA (Analisis Data Statistik)

Dalam penelitian ini, data uji IC₅₀ dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS untuk menentukan data terdistribusi secara normal atau tidak. Analisis normalitas dilakukan menggunakan *Shapiro-Wilk*, sementara analisis homogenitas dilakukan menggunakan *Homogeneity of Variance Test*. Setelah data terdistribusi normal dan homogen, uji selanjutnya yaitu membandingkan data menggunakan metode *One Way Anova*, tetapi jika data dinyatakan tidak normal maka digunakan metode *Kruskal Wallis*. Sementara jika data dinyatakan normal tetapi data dinyatakan tidak homogen, maka dapat dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* tetapi berdampak pada uji lanjut (*Post Hoc Test*). Apabila data dinyatakan tidak homogen maka dapat dilanjutkan dengan uji lanjut dengan metode *Games Howell*, sedangkan jika data diasumsikan homogen maka dapat dilanjutkan dengan metode uji lanjut *Benferroni*.

**Gambar 7. Skema Penelitian**