

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental berbasis laboratorium. Penelitian ini dilakukan uji secara kualitatif dan kuantitatif. Skrining fitokimia dan uji organoleptik merupakan uji kualitatif, sedangkan uji kuantitatif adalah aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Tujuan penelitian ini ialah mengetahui seberapa baik ekstrak tunggal serta kombinasi ekstrak alpukat serta daun salam bekerja sebagai penangkal radikal bebas DPPH.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Juli hingga Agustus 2024 di Laboratorium Kimia Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi atau Sampel Penelitian

1. Populasi pada penelitian kali ini ialah daun alpukat dan daun salam yang didapat dari Rojosari, Kelurahan Sardonoharjo, Kecamatan. Ngaglik, Kabupaten. Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.
2. Sampel pada penelitian ini ialah daun alpukat diambil 5 daun kebawah dari pucuk (Kemit *et al.*, 2016) dan daun salam diambil 5 daun kebawah dari pucuk (Jannah, 2021), daun dipetik pada pagi hari.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas antara lain ekstrak daun salam, ekstrak daun alpukat, serta kombinasi antar keduanya.
2. Variabel terikat antara lain aktivitas peredaman radikal bebas DPPH
3. Variabel Terkendali antara lain tempat tumbuh, kriteria tanaman, waktu panen, waktu pengambilan sampel, suhu dan waktu pengeringan, pelarut, suhu dan waktu ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak Daun Alpukat merupakan serbuk simplisia daun alpukat yang dihasilkan setelah melalui proses ekstraksi maserasi dengan menggunakan etanol 96% sebagai pelarutnya. Hasil akhirnya berupa ekstrak berbentuk kental. Simplisia didapat dari Rojosari, Kelurahan. Sardonoharjo, Kecamatan. Ngaglik, Kabupaten. Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.
2. Ekstrak Daun Salam merupakan serbuk daun salam yang dihasilkan setelah melalui proses ekstraksi maserasi dengan menggunakan etanol 96% sebagai pelarutnya. Hasil akhirnya berupa ekstrak berbentuk kental. Simplisia didapat dari Rojosari, Kelurahan. Sardonoharjo, Kecamatan. Ngaglik, Kabupaten. Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.
3. Uji Fitokimia adalah metode analisis yang dipakai untuk mengetahui komponen-komponen kimia yang terdapat pada tumbuhan, seperti flavonoid, fenol, alkaloid dan terpenoid.
4. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH mengukur tingkat penghambatan terhadap radikal DPPH dengan menggunakan spektrofotometer. DPPH adalah zat yang berpotensi memblokir proses oksidasi. Nilai IC_{50} adalah hasil definitif dari uji peredaman radikal bebas DPPH.
5. DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) adalah suatu metode yang biasanya digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dari suatu senyawa atau ekstrak. Prinsip dasar dari metode ini adalah penghambatan radikal bebas DPPH oleh antioksidan.

F. Alat dan Metode Pengumpulan Data

1. Alat

Batang pengaduk, cawan porselin, corong, erlenmeyer (*Iwaki Pyrex*), gelas ukur (*Iwaki Pyrex*), gelas kimia (*Iwaki Pyrex*), kaca arloji, kompor listrik, labu ukur (*Iwaki Pyrex*), mikropipet, oven, panik, pipet tetes, pipet ukur, pro pipet, sendok tanduk, spatula, Spektrofotometri UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer*), tabung reaksi (*Iwaki Pyrex*), neraca analitik, toples maserasi, wajan, dan vortex.

2. Bahan

Aquadest (Brataco), asetat inhidrat, *Blue tip*, DPPH (Sigma), etanol 96% (Teknis), FeCl₃, HCl (Merck), H₂SO₄ (Merck), kertas saring, kuersetin (Sigma), magnesium, metanol (*Pro analisis*), reagen Mayer, reagen Wagner dan reagen Dragendroff.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi

Dilakukan determinasi tanaman daun alpukat dan daun salam di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi dilaksanakan dengan tujuan agar dapat dipastikan bahwa tanaman yang sedang diteliti adalah tanaman alpukat dan salam.

2. Penyiapan Sampel

Dipanen daun alpukat sebanyak 2,2 kg pada saat pagi hari pukul 06:00 WIB-08:00 WIB, kemudian dilanjutkan panen daun salam 1,4 kg pada pukul 08:00-10:00 WIB. Sampel disortasi kering dengan memilih daun yang memiliki kualitas terbaik dan buang daun yang rusak, berlubang, atau berpenyakit, kemudian dicuci pada air mengalir, disortasi basah dengan tujuan kotoran pada daun yang menempel akan hilang. Kemudian dapat dikeringkan dalam oven pada suhu yang diatur 50°C, selama 48 jam yang ditandai dengan daun ketika diremas mudah hancur. Setelah kering diserbukhaluskan dengan grinder kemudian diayak dengan menggunakan ayakan mesh 40 untuk menyeragamkan ukuran partikel. Setelah itu dilakukan proses ekstraksi (Rauf *et al.*, 2017).

3. Ekstraksi

Simplisia serbuk daun alpukat dan daun salam sampel masing-masing ditimbang seberat 100 g diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 mL perbandingan (1:10 b/v). Maserasi dilakukan selama tiga hari dengan pengadukan, setiap 24 jam sekali diaduk selama 10 menit. Setelah tiga hari, sampel disaring dengan kertas saring,

kemudian dikumpulkan semua filtrat yang didapat. Ampas hasil penyaringan diremaserasi selama satu hari menggunakan pelarut etanol 96% 500 mL dan diaduk 1 kali selama 10 menit. Sampel disaring hingga diperoleh filtrat. Ekstrak kental dihasilkan dengan memanaskan filtrat yang terkumpul menggunakan penangas air pada suhu 60°C. Setelah selesai, kemudian timbang ekstrak kental yang didapat, dihitung nilai rendemen dengan menggunakan persamaan 1. Lalu simpan di dalam lemari pendingin untuk selanjutnya dilakukan proses analisis (Syamsul *et al.*, 2020).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

4. Uji Organoleptik

Proses uji organoleptik ini diamati terkait warna, bau tekstur dan warna dari ekstrak daun alpukat serta daun salam.

5. Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Ditimbang 100 mg sampel, dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Diambil 1 mL kemudian ditambahkan serbuk magnesium 100 mg dan 1 mL HCl, lalu gojok dengan baik dan biarkan campurannya terpisah. Menurut Maravirnadita (2019), jika lapisan berubah warna menjadi merah, kuning, atau orange, ini menandakan bahwa sampel mengandung flavonoid.

b. Uji Fenolik

Ditimbang sebanyak 100 mg sampel dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Diambil 2 mL sampel larutan, dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditetaskan larutan FeCl₃ 1% sebanyak 3 tetes. Menurut Maravirnadita (2019), jika positif larutan akan berubah warna menjadi hijau tua.

c. Uji Terpenoid

Ditimbang sebanyak 100 mg sampel dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Ditambahkan kloroform 3 tetes, asam asetat anhidrat 3 tetes, H₂SO₄ 3 tetes yang merupakan pereaksi lieberman burchard. Menurut

Maravirnadita (2019), jika terlihat bentuk cincin yang terlihat berubah dari warna kecoklatan, maka hal itu menunjukkan uji positif.

d. Uji Alkaloid

1 gram masing-masing ekstrak ditambahkan, ditambahkan 1- mL kloroform, 10 mL amoniak. saring ke dalam tabung reaksi dan hasil filtrat ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 2 N. Campuran kemudian dikocok lalu dibiarkan hingga beberapa menit hingga terlihat 2 lapisan. Kemudian lapisan yang atas dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi sebanyak 1 mL. Lalu ditetesi reagen Mayer, reagen Wagner, reagen Dragendroff. Masing-masing sebanyak 5 tetes (Arianta *et al.*, 2022).

e. Uji Saponin

1 gram masing-masing ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquadest sampai ekstrak terendam. Kemudian dididihkan 2-3 menit lalu dinginkan, kemudian dikocok. Hasil positif jika terbentuk buih yang stabil (Maravirnadita, 2019)

6. Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Ditimbang 3,9 mg DPPH 0,1 mM dan dilarutkan dalam 100 mL metanol *p.a.* (Maravirnadita, 2019).

b. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum

Diambil larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL larutan ditambah metanol 1 mL. Setelah itu, baca absorbansi larutan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 200-700 nm (Maravirnadita, 2019).

c. Penentuan *Operating Time*

2 mL larutan DPPH 0,1 mM ditambahkan dengan 1 mL kuersetin 3 ppm, kemudian aduk sampai tercampur. Setelah itu, baca absorbansi larutan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimal. Dicatat absorbansinya tiap 1-60 menit.

d. Pengukuran Larutan Blanko

Larutan DPPH 0,1 mM dipipet sebanyak 2 mL kemudian diukur pada panjang gelombang 515.

e. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin (100 ppm)

Ditimbang sebanyak 10 mg kuersetin, kemudian larutkan dengan metanol p.a hingga volumenya mencapai 100 mL hasilnya didapatkan konsentrasi larutan stok yaitu 100 ppm (Amalia *et al.*, 2023).

f. Pembuatan Seri Konsentrasi Kuersetin

Seri konsentrasi kuersetin dibuat dalam konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 ppm. Diambil 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL dan 0,5 mL dari larutan stok kuersetin 100 ppm ditambahkan metanol p.a ad 10 mL (Amalia *et al.*, 2023).

g. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak (1000 ppm)

Timbang ekstrak daun alpukat dan daun salam masing-masing 50 mg, lalu ditambahkan dengan metanol p.a 50 mL, dan didapatkan konsentrasi larutan stok yaitu 1000 ppm (Amalia *et al.*, 2023).

h. Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak

Seri konsentrasi kuersetin dibuat dalam konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm. Diambil 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL dan 1 mL dari larutan stok sampel kemudian ditambahkan metanol p.a ad 10 mL.

i. Pembuatan Larutan Sampel Kombinasi Ekstrak Daun Alpukat dan Daun Salam (1000 ppm)

Di pipet larutan induk masing-masing ekstrak 1000 ppm sebanyak 0,2:0,2 mL untuk konsentrasi 20 ppm, 0,4:0,4 mL untuk konsentrasi 40 ppm, 0,6:0,6 mL untuk konsentrasi 60 ppm, 0,8:0,8 mL untuk konsentrasi 80 ppm dan 1:1 mL untuk konsentrasi 100 ppm kemudian ditambahkan metanol p.a ad 10 mL (Amalia *et al.*, 2023).

j. Penetapan Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

2 mL Larutan DPPH 0,1 mM ditambahkan dengan 1 mL larutan sampel dari berbagai seri konsentrasi. Selanjutnya campuran divortex sampai tercampur, setelah itu diamkan ditempat yang gelap sesuai dengan *operating time* yaitu 27 menit. Kemudian dilakukan pembacaan absorbansi

dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal 515 nm terhadap blanko. Campuran antara 1 mL metanol dengan 1 mL sampel digunakan sebagai blanko. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Hasil absorbansi dari setiap sampel yang telah didapatkan digunakan untuk menghitung % inhibisi. Rumus menghitung inhibisi adalah menggunakan persamaan 2.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_{\text{Blanko}} - A_{\text{Sampel}}}{A_{\text{Blanko}}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan:

A_{Blanko} : Absorbansi DPPH tanpa dicampur sampel

A_{Sampel} : Absorbansi DPPH setelah dicampur sampel

Hasil yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam rumus persamaan yaitu :

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y : % inhibisi

a = Gradien

X : Konsentrasi (ppm)

b = Konstanta

IC_{50} merupakan konsentrasi di mana persentase penghambatan sama dengan lima puluh, dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier. Persamaan 3 digunakan untuk mendapatkan nilai IC_{50} .

$$50 = a + bx \dots \dots \dots (3)$$

$$X = \frac{50 - b}{a}$$

X adalah nilai IC_{50} yang diperoleh dengan satuan ppm.

SPSS digunakan untuk menganalisa IC_{50} data nilai yang didapat dari ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam. Uji normalitas menggunakan *Levene statistic* dan *shapiro-wilk* dengan $p > 0,05$. Data yang telah didapatkan data yang normal dan homogen dilanjutkan uji ANOVA *one way* tingkat signifikan $p < 0,05$.