

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis dan rancangan penelitian Perbedaan aktivitas antioksidan ekstrak daun alpukat (*P. americanae Mill.*) berdasarkan perbedaan ketinggian ini menggunakan pra eksperimental dengan rancangan one shot case study. Yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan 2 sampel ekstrak daun alpukat yang tumbuh pada Desa Blitar dan Desa Tulungagung dengan menggunakan metode DPPH lalu diukur dengan spektrofotometri *Uv-Vis*.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun alpukat yang tumbuh di daerah perdesaan Blitar dan Tulungagung. Sampel daun alpukat yang diambil pada desa Blitar yaitu daun alpukat yang berada dikebun rumah ibu Sutarti dan sampel daun alpukat yang diambil pada desa Tulungagung yaitu daun alpukat yang berada diperkebunan Erwin. Daun alpukat yang diambil sebagai sampel merupakan daun alpukat yang tumbuh di ranting pohon mulai dari daun kedua setelah pucuk. Teknik pengambilan daun alpukat sebagai sampel untuk penelitian ini adalah *purposive sampling*, yang merupakan pengambilan sampel yang didasarkan atas kriteria tertentu seperti ciri-ciri sampel, sifat sampel, dan jenis sampel dan umur sampel. kriteria sampel yang diambil yaitu: daun alpukat yang berwarna hijau tua, yang sudah maksimal proses fotosintesis, mulai dari daun kedua setelah pucuk dan usia pohon yang sama.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: simplisia daun alpukat dari desa Blitar dan desa Tulungagung, kuersetin (Sigma), HCl, akuades, magnesium, amilalkohol, alumunium klorida (AlCl_3) 10%, etanol 96%, etanol p.a (Smart-lab), methanol p.a (Smart-lab), asam asetat (Smartlab), dragendroff, besi (III) klorida 1%, HCl 2%, CHCl_3 , lieberman burchard, DPPH (Smart-lab), asam askorbat, alumunium foil, diklorometan (Merk) dan etil asetat (Brathacem).

3.3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Spektrofotometer *Uv-Vis* (Thermo), neraca analitik digital (aeAdam), labu ukur (Bomex), chamber, kaca arloji (Hebei), spatel logam, pipet tetes, cawan penguap, vial, beaker glass (iwaki), penjepit kayu, tabung reaksi, corong (Xuebei).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi konsentrasi ekstrak kental etanol daun alpukat Desa Blitar dan Desa Tulungagung.

3.4.2 Variable Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah skrinning fitokimia, pengujian perbandingan flavonoid total dan pengujian aktivitas

antioksidan ekstrak etanol daun alpukat Desa Blitar dan Desa Tulungagung.

3.4.3 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Tabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1.	Konsentrasi ekstrak kental etanol daun alpukat Desa Blitar dan Desa Tulungagung.	Konsentrasi yang diambil dari sampel yang dibuat variasi konsentrasi	Pengujian menggunakan alat spektrofotometer <i>Uv-Vis</i> , untuk mencari nilai absorbansi pada larutan uji	-	-
Variabel Terikat					
1.	Skrinning fitokimia alkaloid	Pengujian yang menyatakan adanya metabolit sekunder menggunakan pereaksi, dengan perubahan warna yang menandakan terdapat senyawa alkaloid pada tanaman	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
2.	Skrinning fitokimia flavonoid	Pengujian yang menyatakan adanya metabolit sekunder	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif

		menggunakan pereaksi, dengan perubahan warna yang menandakan terdapat senyawa flavonoid pada tanaman				
3.	Skrinning fitokimia tanin	Pengujian yang menyatakan adanya metabolit sekunder menggunakan pereaksi, dengan perubahan warna yang menandakan terdapat senyawa tanin pada tanaman	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif	
4.	Skrinning fitokimia saponin	Pengujian yang menyatakan adanya metabolit sekunder menggunakan pereaksi, dengan perubahan warna yang menandakan terdapat senyawa saponin pada tanaman	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif	
5.	Skrinning fitokimia steroid	Pengujian yang menyatakan adanya metabolit sekunder menggunakan pereaksi, dengan perubahan warna yang menandakan terdapat senyawa steroid pada tanaman	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif	

6.	Skrinning fitokimia triterpenoid	Pengujian menyatakan metabolit menggunakan pereaksi, dengan perubahan warna yang menandakan terdapat senyawa triterpenoid pada tanaman	yang adaanya sekunder	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
7.	Uji perbandingan flavonoid total ekstrak etanol daun alpukat Desa Blitar dan Desa Tulungagung	Uji perbandingan flavonoid total dilakukan dengan alat spektrofotometer <i>Uv-Vis</i> untuk menunjukkan adanya flavonoid di dalam ekstrak etanol daun alpukat		Spektrofotometer <i>Uv-Vis</i>	Rasio	mgQE/g (berat ekstrak)
8.	Uji DPPH	Variasi konsentrasi larutan DPPH diuji dengan menggunakan spektrofotometer <i>Uv-Visible</i>		spektrofotometer <i>Uv-Visible</i>	Rasio	% (Persen)
9.	Uji IC ₅₀	Nilai IC ₅₀ ditentukan dengan menggunakan perhitungan regresi linear untuk menghitung kemampuan penghambatan 50% radikal bebas		Perhitungan regresi linear	Rasio	% (persen)

10.	Uji perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun alpukat Desa Blitar dan Desa Tulungagung	Uji perbandingan aktivitas antioksidan dilakukan dengan alat spektrofotometer <i>Uv-Visible</i> untuk menunjukkan adanya aktivitas antioksidan di dalam ekstrak etanol daun alpukat	spektrofotometer <i>Uv-Visible</i>	Rasio	ppm
-----	---	---	------------------------------------	-------	-----

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Daun alpukat (*P. americana* Mill.) dideterminasi terlebih dahulu di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur, determinasi ini dilakukan agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengambilan bahan baku yang akan dipakai untuk penelitian dan untuk memastikan jenis tumbuhan yang digunakan dengan mengidentifikasi ciri-ciri morfologi tumbuhan daun alpukat dengan melihat acuan pustaka.

3.5.2 Pembuatan Simplisia

Tanaman alpukat yang digunakan untuk membuat simplisia yaitu merupakan bagian daun. Sampel daun alpukat yang didapatkan di Desa Blitar dan Desa Tulungagung. Daun alpukat yang digunakan yaitu daun alpukat berwarna hijau tua, yang sudah maksimal proses fotosintesis, mulai dari daun kedua setelah pucuk dan usia pohon yang sama. Daun alpukat disortasi dari benda asing terlebih dahulu, dicuci dengan air mengalir lalu ditiriskan, kemudian keringkan lalu dijemur di bawah sinar

matahari selama 5 jam, dikarenakan sinar matahari mampu bekerja dengan baik, daun alpukat dijemur sampai kering. Kemudian daun alpukat yang sudah kering dibuat serbuk dengan cara diblender lalu diayak pada ayakan 40 mesh.

3.5.3 Ekstraksi

Ekstraksi pada daun alpukat menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut ethanol 96%. Simplisia daun alpukat Blitar sebanyak 150 gram dan simplisia daun alpukat sebanyak 300 gram dimasukkan kedalam maserator kemudian masing-masing simplisia ditambahkan dengan 1 L larutan ethanol 96% diamkan selama 3 x 24 jam. Hasil ekstrak yang disaring sebagai filtrat 1. Kemudian melakukan ekstraksi kembali, menggunakan sisa ampas maserasi sebelumnya, dengan menambahkan 500 mL larutan ethanol 96% diamkan selama 1 x 24 jam lalu disaring sebagai filtrat 2. Filtrat 1 dan filtrat 2 dicampurkan, kemudian dievaporasi dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak pekat.

3.5.4 Skrinning Fitokimia

Skrinning fitokimia yang dilakukan dalam penelitian ini adalah:

1) Alkaloid

Ektrak daun alpukat ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi dreagendroff, amati hasil jika jika positif alkaloid maka akan terbentuk warna jingga.

2) Flavonoid

Ekstrak daun alpukat diambil sebanyak 1 mL, lalu dimasukkan 2 tetes HCl, serbuk magnesium dan 2 tetes amilalkohol, amati perubahan yang terjadi jika adanya flavonoid maka terbentuk warna kuning atau jingga atau merah.

3) Tanin

Ekstrak daun alpukat diambil sebanyak 1 mL, lalu ditetaskan larutan besi (III) klorida 1% secukupnya, amati perubahan yang terjadi. Jika adanya tanin maka terbentuk larutan hitam kehijauan.

4) Saponin

Ekstrak daun alpukat dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan air panas. Amati perubahan yang terjadi terhadap busa, reaksi positif jika busa bertahan selama 30 menit dan tidak hilang jika ditambahkan dengan 1 tetes HCl 2N.

5) Steroid

Ekstrak daun alpukat diambil dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 tetes larutan CHCl_3 , kemudian ditambahkan 3 tetes pereaksi Lieberman burchard. Amati perubahan yaitu dengan terbentuknya warna merah pertama kali pada larutan yang kemudian berubah menjadi biru dan hijau.

6) Triterpenoid

Ekstrak daun alpukat dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 2 tetes larutan CHCl_3 , kemudian ditambahkan 3 tetes pereaksi Lieberman burchard. Amati perubahan yaitu dengan terbentuknya warna merah ungu.

3.5.5 Penetapan Flavonoid Total Ekstak Daun Alpukat

1. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Menimbang sebanyak 10 mg kuersetin lalu dilarutkan 100 mL ethanol 96% untuk 100 ppm, kemudian dibuat larutan kuersetin lagi untuk konsentrasi 20; 40; 60; 80; 100 ppm. Sebanyak 10 mL didalam labu ukur dan ditambahkan dengan ethanol 96% sampai batas labu ukur (Diah *et al*, 2018).

2. Pembuatan Larutan AlCl_3 10%

Menimbang alumunium klorida sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 10 mL lalu larutkan dengan aquadest hingga tanda batas (Diah *et al*, 2018).

3. Pembuatan Larutan Asam Asetat 5%

Melarutkan 5 mL asam asetat kemudian dicampurkan dengan aquadest dalam labu ukur 100 mL lalu tambahkan etanol hingga tanda batas (Diah *et al*, 2018).

4. Panjang Gelombang Maksimum

Pada penguuran panjang gelombang, diambil 1 mL larutan kuersetin lalu ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam

asetat 5% lalu diukur dengan spektrofotometer *Uv-Vis* dengan range 350 nm sampai 450 nm, hasil panjang gelombang maksimum yang didapatkan yaitu 415,05 nm (Diah *et al*, 2018).

5. Operating Time (OT)

Larutan quersetin diambil sebanyak 1 mL lalu ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%, lalu diukur menggunakan spektrofotometer *Uv-Vis* dengan panjang gelombang 415,05 nm, diukur dengan interval 2 menit selama 1 jam (Diah *et al*, 2018).

6. Penetapan Kurva Baku Kuersetin

Larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm digunakan sebagai larutan baku standar. Dibuat seri konsentrasi 20; 40; 60; 80; 100 ppm. Diambil sebanyak 1 mL dari larutan masing-masing seri konsentrasi lalu ditambahkan dengan AlCl_3 10% sebanyak 1 mL dan asam asetat 8 mL. pembacaan absorbansi kurva baku dilakukan menggunakan spektrofotometri *Uv-Vis* diamkan selama 30 menit pada panjang gelombang 415 nm (Anita *et al*, 2019; Sukmawati *et al*, 2018).

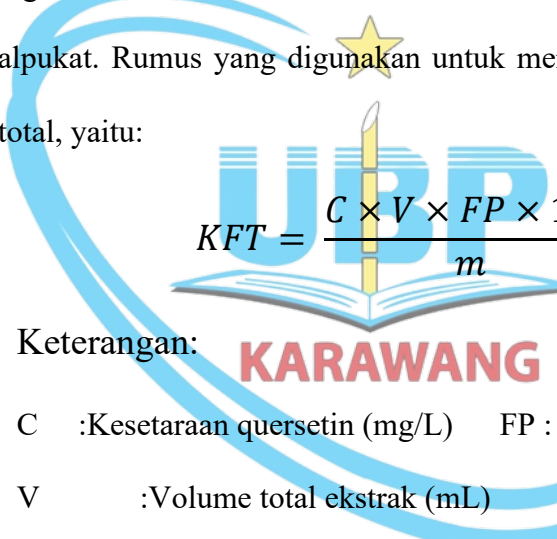
7. Penetapan Flavonoid Total Ekstrak Daun Alpukat

Penetapan flavonoid total merujuk pada metode chang dengan beberapa konsentrasi yang menggunakan kuersetin sebagai larutan standar. Menimbang ekstrak etanol daun alpukat masing-masing sebanyak 10 mg yang dilarutkan didalam labu ukur dengan 10 mL etanol 96% hingga batas. Kemudian larutan dipipet sebanyak 0,5 mL

lalu ditambahkan dengan 1,5 mL etanol 96%, 0,1 AlCl₃ 10%, 0,1 mL natrium asetat 1M dan 2,8 mL aquades. Setelah itu diinkubasi selama 1 menit, kemudian diukur absorbansinya pada spektrofotometer *Uv-Vis* dengan panjang gelombang 400 nm, dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan (Sukmawati *et al*, 2018; Dina, 2020).

8. Pengujian Flavonoid Total

Hasil data yang diperoleh dari pengukuran absorbansi yaitu digunakan untuk mencari kadar flavonoid total ekstrak etanol daun alpukat. Rumus yang digunakan untuk menghitung kadar flavonoid total, yaitu:


$$KFT = \frac{C \times V \times FP \times 10^{-3}}{m} \times 100\%$$

Keterangan:

C : Kesetaraan quersetin (mg/L) FP : Faktor pengenceran

V : Volume total ekstrak (mL) m : Berat sampel (mg)

3.5.7 Penetapan Aktivitas Antioksidan Ekstak Daun Alpukat

1. Pembuatan Larutan DPPH 100 ppm

Menimbang sejumlah 5 mg serbuk DPPH kemudian dilarutkan kedalam 50 mL etanol p.a dan didapatkan konsentrasi 100 ppm (Muchammad dan Evie, 2020)

2. Pembuatan Larutan Blanko

Memipet 1 mL larutan DPPH 100 ppm, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL yang sudah di bungkus dengan alumunium foil

kemudian ditambahkan dengan etanol pro analisis sebanyak 10 mL, dikocok sampai dengan homogen, selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit (Muchammad dan Evie, 2020).

3. Pembuatan Larutan Induk Standar Vitamin C 50 ppm

Menimbang sejumlah 2,5 mg asam askorbat (Vitamin C) kemudian dilarutkan dengan 50 mL etanol pro analisis didalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas, kemudian dikocok hingga homogen (Muchammad dan Evie, 2020).

4. Pembuatan Deret Standar Vitamin C

Membuat deret standar vitamin C dengan konsentrasi 1; 3; 5; 7; dan 9 ppm dari larutan vitamin C. lalu ditambahkan 10 mL etanol pro analisis didalam labu ukur sampai tanda batas. Lalu dari masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL, dan ditambahkan dengan 1 mL larutan DPPH, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Lalu diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrometer *Uv-Visible* pada panjang gelombang 515 nm dan dilakukan secara tiga kali pengulangan (Muchammad dan Evie, 2020).

5. Pembuatan Larutan Uji 1000 ppm

Menimbang masing-masing ekstrak etanol daun alpukat sebanyak 100 mg lalu dilarutkan dengan 100 mL etanol pro analisis didalam labu ukur 100 mL, kemudian larutan dibuat variasi konsentrasi 50; 70; 90; 110; 130 ppm. Setelah itu dari masing-masing konsentrasi ditambahkan dengan etanol p.a sebanyak 10 mL didalam

labu ukur. Kemudian masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL dan ditambahkan larutan DPPH sebanyak 1 mL, lalu di inkubasi selama 30 menit. Lalu diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrometer *Uv-Visible* pada panjang gelombang 515 nm dan dilakukan secara tiga kali pengulangan (Muchammad dan Evie, 2020).

6. Pengujian Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

a) Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Hasil data yang diperoleh dari pengukuran absorbansi yaitu digunakan untuk mencari presentase hambatan. Rumus yang digunakan untuk menghitung presentase hambatan DPPH yaitu:

$$\%Inhibisi = \frac{Abs\ kontrol - Abs\ sample}{Abs\ kontrol} \times 100\%$$

b) Perhitungan Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan uji (x) dengan % inhibisi (y). Nilai IC₅₀ dihitung dengan cara memperoleh dari persamaan regresi linear, yaitu:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

y: 50 (% hambatan)

a: intersep

x: Konsentrasi IC₅₀

b: Slop

3.6 Analisis Data

Flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun alpukat dianalisis perbandingan menggunakan software SPSS yaitu *uji One Way ANOVA*. Dengan cara berikut ini:

a) Pengujian Hipotesis

H_0 : Tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan

H_1 : Terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan

b) Pengambilan Kesimpulan

Pengambilan kesimpulan dilakukan dengan membandingkan hasil yang ada pada statisti. Apabila Sig. $>0,05$ maka H_0 diterima, yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan. Dan apabila Sig. $<0,05$ maka H_0 ditolak, yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan.

c) Analisis lanjutan uji Duncan

Setelah melakukan uji *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan dari ekstrak etanol daun alpukat masing-masing daerah, lalu dilanjutkan dengan uji Duncan.

1.7 Diagram Alir Penelitian

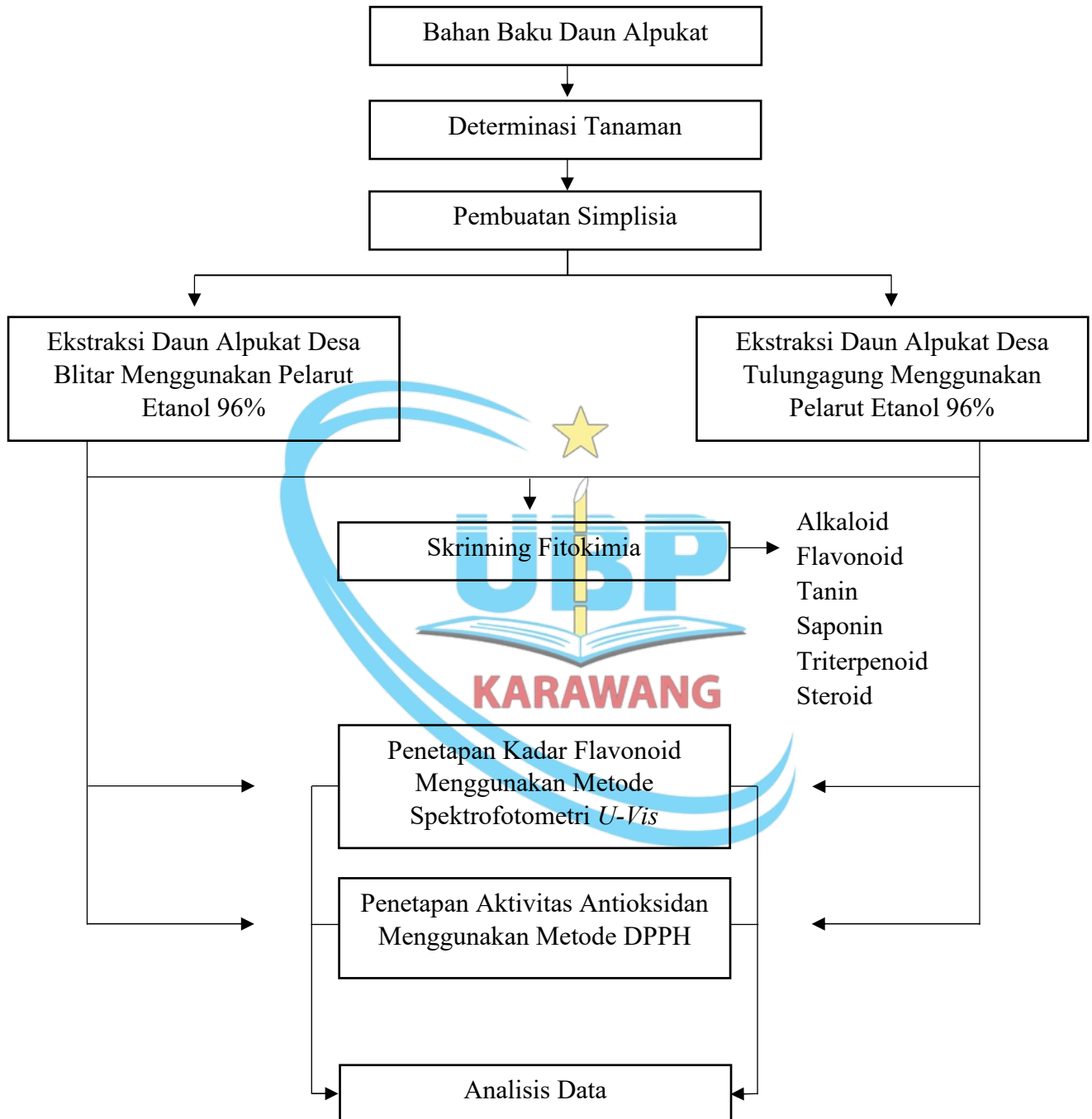


Diagram 3. 1 Diagram Alir Penelitian

