

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah pendekatan eksperimental. Pengukuran total fenol, total flavonoid menggunakan metode kolorimetri dan uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode penangkalan radikal bebas 2,2-*diphenyl-1-picrylhydrazyl* atau DPPH.

B. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah pengembangan dan optimasi pelarut untuk menentukan total fenol, total flavonoid dan aktivitas antioksidan pada biji buah alpukat. Kriteria biji yang diambil yaitu dari alpukat dengan warna kulit hijau cerah kekuningan, daging buah matang, berukuran standar varietas, dan dipanen pada waktu sore hari. Teknik pengambilan sampel penelitian ini dilakukan dengan teknik *purposive sampling*, yaitu suatu teknik penentuan dan pengambilan sampel yang ditentukan oleh peneliti dengan pertimbangan tertentu. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Setia Budi Surakarta pada April-Juli tahun 2025.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah semua biji buah alpukat. Sampel pada penelitian ini adalah biji buah alpukat mentega yang diperoleh di Sleman, Yogyakarta yang akan diuji fenol total, flavonoid total, dan aktivitas antioksidan menggunakan metode SLD. Alpukat yang diambil dalam keadaan segar pada waktu sore hari untuk menjaga kualitas sampel yang digunakan, biji alpukat dengan keadaan daging buah masak yang akan menjadi sampel untuk penelitian.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah biji alpukat yang diperoleh di Sleman, Yogyakarta untuk di optimasi pelarut pada proses ekstraksi total fenol, total flavonoid, dan uji aktivitas antioksidannya.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama diidentifikasi dalam beberapa macam variabel antara lain, variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas merupakan variabel dapat diubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas penelitian ini adalah jenis dan konsentrasi pelarut ekstraksi, dan konsentrasi sampel pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Variabel tergantung penelitian ini yaitu jumlah rendemen, total fenol (mgGAE/g ekstrak), total flavonoid (mgQE/g Ekstrak), dan aktivitas antioksidan biji alpukat ($\mu\text{g/mL}$). Variabel terkendali penelitian ini yaitu asal tanaman, volume pelarut, metode ekstraksi, uji aktivitas antioksidan, suhu, waktu, kondisi alat, dan kondisi laboratorium.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, biji alpukat yang digunakan diperoleh di beberapa daerah yaitu Sleman, Yogyakarta untuk dianalisis total fenol, total flavonoid dan aktivitas antioksidannya.

Kedua, kandungan total fenol sampel biji alpukat dalam ekuivalen asam galat (GAE). Fenol total diperoleh menggunakan rumus perhitungan dimana total fenol (sumbu x) dalam sampel dengan absorbansi (sumbu y) pada persamaan regresi linier dengan pembanding asam galat.

Ketiga, kandungan total flavonoid sampel biji alpukat dalam ekuivalen kuersetin (QE). Kadar total flavonoid diperoleh menggunakan rumus perhitungan total flavonoid, total flavonoid (sumbu x) dalam sampel dengan absorbansi (sumbu y) pada persamaan regresi linier dengan pembanding kuersetin.

Keempat, aktivitas antioksidan dilihat terhadap nilai IC_{50} (*inhibitory concentration 50%*) yaitu konsentrasi sampel yang dapat melakukan peredaman DPPH sebesar 50%. Nilai IC_{50} ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi linear. Pembanding yang digunakan pada uji aktivitas antioksidan adalah penggunaan pembanding asam askorbat.

Kelima, optimasi pelarut pada proses ekstraksi total flavonoid dan uji antioksidan ekstrak ditentukan dengan menggunakan metode *simplex lattice design* (SLD) dan analisis yang digunakan yaitu analisis ANOVA sistem *design expert* (nilai $p < 0,05$). Pengolahan data menggunakan aplikasi *Microsoft Excel 2021*.

E. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan pada penelitian ini adalah biji alpukat yang diperoleh dari beberapa daerah yaitu Sleman. Bahan kimia yang digunakan antara

lain: Etanol 70%, aseton (*merck*), akuades, natrium asetat (*merck*), aluminium (III) klorida (*merck*), pereaksi dragendroff, natrium hidroksida (*merck*), gelatin, besi (III) klorida (*merck*), asam sulfat (*merck*), etanol p.a (*merck*), metanol p.a (*merck*), asam askorbat (*sigma-aldrich*), asam galat (*sigma-aldrich*), kuersetin (*sigma-aldrich*), pereaksi follin-ciocalteu (*merck*), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, *sigma*).

2. Alat

Alat yang pada penelitian ini adalah erlenmeyer (*pyrex*), gelas beker (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), labu ukur (*pyrex*), cawan porselen, batang pengaduk, ayakan mesh 60, kertas saring, tabung reaksi (*pyrex*), pipet ukur (*pyrex*), mikropipet (*pyrex*), *magnetic stirer*, *moisture balance*, timbangan analitik (*mettler toledo*), kuvet (*thermo scientific*), spektrofotometri UV-Vis (*shimadzu uv-1800*), *rotary vacuum evaporator* (*buchi R-100*), *sonicator bath* 3800 (*elma S30H*), penangas air (*thermo scientific*).

F. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di UPT laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta, dengan tujuan untuk memastikan kebenaran dan keaslian identitas tanaman.

2. Persiapan Bahan dan Permbuatan Serbuk Simplisia

2.1. Pengambilan bahan. Persiapan bahan antara lain pengumpulan, determinasi tanaman, dan pengolahan bahan menjadi simplisia serta penyimpanan simplisia biji alpukat. Bahan simplisia berupa biji buah alpukat yang diperoleh di Sleman, Yogyakarta. Bagian yang dikumpulkan adalah bagian biji buah yang belum tumbuh tunas daun. Biji buah alpukat diperoleh dari alpukat berwarna hijau cerah kekuningan dengan daging buah matang, dipanen sore hari.

2.2. Pembuatan serbuk. Biji alpukat serbuk ditimbang sebanyak 20g dimasukkan dalam wadah dengan perbandingan pelarut yang telah ditentukan pada tabel 2, serbuk biji alpukat sebanyak 20g pada masing-masing run lalu diekstraksi menggunakan metode sonikasi dengan beberapa pelarut antara lain: aseton, akuades, dan etanol 70% untuk uji penentuan fenol total, flavonoid total, dan uji antioksidan. Berikut komposisi pelarut hasil keluaran dari sistem *Design expert 13* dengan metode SLD:

Tabel 2. Komposisi pelarut ekstraksi

Komposisi	Aseton	Akuades	Etanol 70%
1	33,3333	33,3333	33,3333
2	33,3333	0	66,6667
3	16,6667	16,6667	66,6667
4	66,6667	0	33,3333
5	0	0	100
6	66,6667	33,3333	0
7	0	33,3333	66,6667
8	0	66,6667	33,3333
9	16,6667	66,6667	16,6667
10	100	0	0
11	0	0	100
12	100	0	0
13	0	100	0
14	0	100	0
15	33,3333	33,3333	33,3333
16	33,3333	66,6667	0
17	66,6667	16,6667	16,6667

3. Optimasi ekstrak

Optimasi ekstraksi biji alpukat sesuai dengan *Ultrasound-assisted Extraction* (UAE) yang dilakukan modifikasi. Serbuk biji alpukat sebanyak 20 g dalam erlemeyer ditambah pelarut aseton, akuades, dan etanol sebagai pelarut dengan rasio serbuk biji alpukat (b/v). Sampel diekstrak menggunakan *sonicator bath* pada frekuensi 40 kHz dengan suhu ekstraksi terjaga (40-50°C) dan waktu ekstraksi terjaga (40-50 menit). Filtrasi dilakukan dan evaporasi dengan rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental (Kunarto *et al.*, 2019).

4. Identifikasi Senyawa Kimia

Skrining kimia awal dilakukan untuk mengetahui konstituen tanaman seperti alkaloid, senyawa fenolik, tanin, flavonoid, terpenoid, dan, saponin dalam ekstrak biji alpukat.

4.1. Penentuan Alkaloid. Ekstrak dilarutkan secara terpisah dalam asam klorida encer sebanyak 2 mL dan disaring. Uji *Dragendorff*: Filtrat diperlakukan dengan 3-4 tetes pereaksi *Dragendorff* (larutan Kalium Bismut Iodida). Pembentukan endapan merah menunjukkan adanya alkaloid (Noorul *et al.*, 2017).

4.2. Penentuan Saponin. 0,5 g ekstrak dikocok dengan akuades 2 mL. Busa stabil bertahan selama 10 menit maka mengindikasikan adanya kandungan saponin (Noorul *et al.*, 2017).

4.3. Penentuan Tanin. Uji Gelatin: Pada ekstrak ditambahkan 2 mL gelatin 1% dalam natrium klorida. Endapan putih yang terbentuk menunjukkan adanya tanin (Noorul *et al.*, 2017).

4.4. Penentuan Fenolik. Uji Ferri Klorida: Ekstrak diperlakukan 3-4 tetes larutan besi klorida. Warna hitam kebiruan yang terbentuk menunjukkan adanya fenol (Noorul *et al.*, 2017).

4.5. Penentuan Flavonoid. Uji Pereaksi Alkali: Ekstrak diperlakukan dengan 3-4 tetes larutan natrium hidroksida. Pembentukan warna kuning pekat, yang menjadi tidak berwarna pada penambahan asam encer, menunjukkan adanya flavonoid (Noorul *et al.*, 2017).

4.6. Penentuan Terpenoid. Ekstrak diperlakukan dengan 2 ml asam sulfat dan 2 ml kloroform. Warna merah menunjukkan adanya terpenoid (Noorul *et al.*, 2017).

5. Penetapan Karakterisasi Ekstrak

5.1. Penentuan Parameter Non-Spesifik. Adapun penentuan parameter non-spesifik meliputi: penentuan kadar air dan susut pengeringan, penentuan kadar abu total, dan penentuan kadar abu tidak larut asam.

5.1.1. Penetapan kadar air. Ekstrak 0,5 gram ditimbang dan ditara. Ekstrak dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dengan oven, lalu ditimbang. Kemudian dimasukkan kedalam *Halogen Moisture Analyzer* pada suhu 105°C selama 30 menit atau hingga bobot tetap. Persentase kadar air dihitung berdasarkan berat awal sampel (Depkes RI, 2000).

5.1.2. Susut Pengeringan. Ekstrak 0,5 gram ditimbang dalam wadah yang sudah ditara. Ekstrak dikeringkan pada suhu 105°C selama 30 menit dalam oven, lalu ditimbang. Kemudian dimasukkan kedalam *Halogen Moisture Analyzer* pada suhu 105°C selama 30 menit atau hingga bobot tetap. Berat tetap dihitung berdasarkan berat awal sampel (Depkes RI, 2000).

5.1.3. Kadar Abu total. Ekstrak 2-3 g halus lalu dimasukkan dalam krus yang sudah dipijar dan ditara, arang pijarkan hingga habis, tunggu hingga dingin dan timbang (Kemenkes RI, 2017).

5.1.4. Kadar Abu Tidak Larut Asam. Abu yang diperoleh pada kadar abu total di didihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, saring bebas abu lalu dicuci air panas, ekstrak dipijarkan pada krus hingga bobot tetap (suhu 800±25°C). Abu tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji dan dinyatakan satuan % b/b (Kemenkes RI, 2017).

5.2. Penentuan parameter spesifik. Adapun penentuan parameter spesifik antara lain, penentuan identitas dan organoleptik, penentuan kadar sari larut air, dan kadar sari larut etanol.

5.2.1. Identitas ekstrak. Identitas ekstrak ditentukan dengan beberapa aspek antara lain deskripsi tata nama ekstrak, nama latin, bagian yang digunakan, nama umum, dan senyawa identitas yang terdapat pada tumbuhan tersebut (Depkes RI, 2000).

5.2.2. Organoleptik. Panca indera mendeskripsikan secara langsung mengenai bentuk, bau, warna, dan rasa, yang dilakukan dengan seobyektif mungkin untuk identifikasi ekstrak tersebut (Depkes RI, 2000).

5.2.3. Kadar sari larut air. Ekstrak 0,5 gram ekstrak direndam dengan 20 mL kloroform:akuades (1:1) lalu disaring. Filtrat sebanyak 20 mL diuapkan hingga kering dalam cawan, sisa padatan dipanaskan pada suhu 105°C sampai beratnya konstan. Persen kadar senyawa larut air dihitung terhadap berat awal ekstrak (Depkes RI, 2000).

5.2.4. Kadar sari larut etanol. Ekstrak 0,5 gram ekstrak direndam 20 ml etanol. Larutan maserasi disaring dengan cepat untuk mencegah etanol menguap, 20 mL filtrat diuapkan hingga mengering di dalam cawan, dan residu dipanaskan pada suhu 105°C sampai beratnya stabil. Kadar senyawa larut etanol dihitung dalam persentase terhadap berat awal ekstrak (Depkes RI, 2000).

6. Penetapan Fenol Total

6.1. Pembuatan Larutan Baku Sampel. Ditimbang masing-masing ekstrak biji alpukat seberat 40 mg, 3 ml metanol ditambahkan sampai tanda batas kocok hingga larut, lalu masukkan dalam labu takar 5 ml tambahkan metanol p.a membuat konsentrasi 4000 µg/mL.

6.2. Pembuatan Seri Deret Konsentrasi. Dibuat seri deret konsentrasi asam galat sebesar 30, 45, 60, 75, dan 90 ppm. Larutan seri konsentrasi tersebut dibuat dari larutan induk asam galat konsentrasi 400 ppm. Dipipet larutan induk asam galat 400 ppm dipipet 0,75; 1,125; 1,5; 1,875; dan 2,25 mL, dilarutkan metanol p.a pada labu takar 10 ml dan dihomogenkan

6.3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Dipipet 1 mL larutan asam galat ke dalam vial, ditambahkan 5 mL follin ciocalteu (7,5%), diamkan 8 menit kemudian tambahkan 4 mL NaOH 1%, inkubasi di tempat gelap selama 60 menit. Dibaca serapannya

menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600-800 nm.

6.4. Penentuan *Operating Time* (OT). Dipipet 1 mL larutan asam galat ke dalam vial, ditambahkan 5 mL follin ciocalteu (7,5%), inkubasi selama 6 menit kemudian 4 mL NaOH 1% ditambahkan, inkubasi selama 60 menit di tempat gelap kemudian dibaca serapan menggunakan spektrofotometer UV-visibel dalam rentang waktu 0-60 menit pada gelombang maksimum yang telah didapat hingga diperoleh waktu serapan yang stabil.

7.5. Pembuatan Kurva Baku Asam Galat. Larutan standar asam galat disiapkan dengan konsentrasi 30, 45, 60, 75, dan 90 ppm. Setiap konsentrasi sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam vial, kemudian ditetesi dengan 5 mL reagen folin–Ciocalteu (7,5 %). Biarkan selama 8 menit, lalu tambahkan 4,0 mL natrium hidroksida (NaOH) 1 %, dan inkubasi selama 60 menit. Setelah inkubasi, kadar larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang maksimum. Seluruh prosedur diulang tiga kali untuk setiap perlakuan. Nilai serapan diambil pada rentang panjang gelombang sekitar 600–800 nm. Untuk kontrol (blanko), prosedur serupa diterapkan, tetapi tanpa menambahkan larutan uji. Dari data serapan yang diperoleh, kurva kalibrasi dibuat dan digunakan untuk menghitung konsentrasi larutan uji (Kemenkes RI, 2017).

7. Penetapan Flavonoid Total

7.1. Pembuatan Larutan Baku Sampel. Masing-masing ekstrak biji alpukat ditimbang sebanyak 40 mg, kemudian ditambahkan etanol p.a sebanyak 3 mL hingga mencapai tanda batas, lalu dikocok hingga larut sempurna. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu takar berkapasitas 5 mL, kemudian ditambahkan kembali etanol p.a sampai tanda batas untuk memperoleh konsentrasi akhir sebesar 4000 µg/mL.

7.2. Pembuatan Seri Deret Konsentrasi. Dibuat seri deret konsentrasi kuersetin sebesar 25, 40, 55, 70, dan 85 ppm. Larutan seri konsentrasi tersebut dibuat dari larutan induk kuersetin konsentrasi 400 ppm. Dipipet larutan induk kuersetin 400 ppm dipipet sebanyak 0,6mL; 0,9mL; 1,2mL; 1,5mL; dan 1,8mL, dilarutkan etanol p.a pada labu takar 5mL dan dihomogenkan.

7.3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Dipipet 0,5 mL kuersetin konsentrasi 50 ppm ke vial, ditambahkan 1,5 mL etanol

p.a, 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan 2,8 ml akuades. Dibaca serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-600 nm.

7.4. Penentuan *Operating Time* (OT). Sebanyak 0,5 mL larutan kuersetin 50 ppm diambil menggunakan pipet dan dimasukkan ke dalam vial. Selanjutnya, ditambahkan 1,5 mL etanol p.a, 0,1 mL larutan AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, serta 2,8 mL akuades. Campuran tersebut kemudian diukur nilai serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan, dalam interval waktu 0–30 menit, hingga diperoleh hasil serapan yang stabil.

7.5. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin. Setiap konsentrasi kuersetin (25, 40, 55, 65, dan 80 ppm), ambil 0,5 mL larutan dengan pipet, lalu pindahkan ke dalam vial. Tambahkan 1,5 mL etanol p.a., 0,1 mL larutan AlCl_3 10 %, 0,1 mL larutan natrium asetat 1 M, dan 2,8 mL aquades. Kocok campuran tersebut dan biarkan selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu, ukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Ulangi pengukuran untuk setiap perlakuan sebanyak tiga kali. Untuk blanko, lakukan prosedur yang sama namun tanpa menambahkan AlCl_3 . Buatlah kurva kalibrasi, lalu hitung konsentrasi kuersetin dalam larutan uji (Kemenkes RI, 2017).

8. Penetapan Aktivitas Antioksidan

8.1. Pembuatan larutan DPPH. DPPH dibuat larutan dengan menimbang 15,77 mg serbuk DPPH, larutkan dengan metanol sampai 100 mL (0,4 mM) (Alim *et al.*, 2022).

8.2. Pembuatan larutan ekstrak dan deret baku. Pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak biji alpukat dilakukan dengan menimbang 5 mg ekstrak, kemudian melarutkannya dalam metanol p.a hingga volume 10 mL sehingga diperoleh larutan stok berkonsentrasi 500 ppm. Dari larutan stok tersebut, dipipet sejumlah tertentu untuk menyiapkan larutan uji dengan konsentrasi bertingkat, yaitu 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm (Kunarto *et al.*, 2019). Masing-masing larutan uji ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM, kemudian diencerkan dengan metanol hingga mencapai volume akhir pada labu ukur. Sampel didiamkan selama 35 menit sebelum absorbansinya diukur pada panjang gelombang 517 nm (Septiawan *et al.*, 2020).

8.3. Pembuatan larutan pembanding asam askorbat. Pada pengujian aktivitas antioksidan ini, larutan pembanding yang digunakan adalah asam askorbat. Larutan standar asam askorbat dengan konsentrasi 1000 ppm disiapkan dengan menimbang 10 mg asam askorbat, kemudian melarutkannya dalam metanol p.a hingga volume akhir mencapai 10 mL. Larutan ini digunakan sebagai pembanding untuk ekstrak 1000 ppm. Selanjutnya, dari larutan induk ekstrak 500 ppm, dibuat deret konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Masing-masing larutan uji kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan diencerkan hingga tanda batas. Sampel dikocok ringan, ditutup, lalu diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm (Septyanani *et al.*, 2023).

8.4. Penentuan Nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50*) merupakan parameter yang menggambarkan konsentrasi sampel uji yang mampu mereduksi radikal bebas DPPH hingga mencapai 50% (menghambat proses oksidasi sebesar setengah dari total reaksi). Penentuan IC_{50} dilakukan dengan memplot hubungan linier antara konsentrasi larutan sampel pada sumbu x dan persentase peredaman pada sumbu y. Kontur tersebut diperoleh persamaan garis $y = bx + a$, di mana y mewakili persentase peredaman dan x adalah nilai IC_{50} yang dicari. Sebagai kontrol positif, digunakan larutan asam askorbat (Agustin & Suroso, 2022).

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

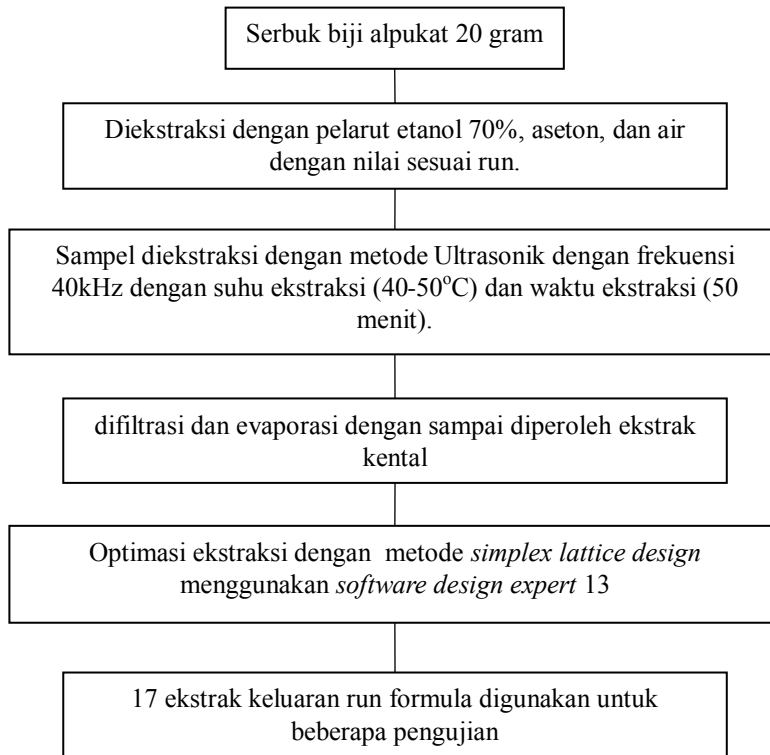
G. Analisis Data

Eksperimen ini disusun menggunakan metode *Box–Behnken design* dengan parameter yang diamati meliputi rendemen, kadar fenol total, flavonoid total, dan aktivitas antioksidan. Proses optimasi pelarut pada ekstrak dilakukan melalui pendekatan *simplex lattice design* menggunakan *Design Expert versi 13*. Setiap pengujian dilaksanakan dalam tiga kali ulangan, kemudian hasilnya dinyatakan sebagai rata-rata \pm standar deviasi dan dianalisis menggunakan ANOVA dari sistem *design expert* ($p < 0,05$). Pengolahan serta analisis data dilakukan menggunakan *Microsoft Excel 2021*.

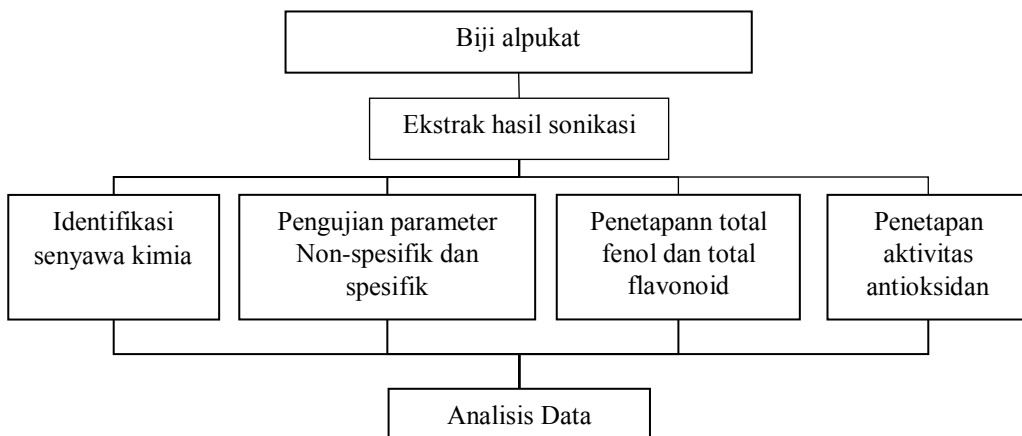
H. Jadwal Penelitian

Penelitian dilakukan pada April hingga Juli Tahun 2025, adapun tempat penelitian di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

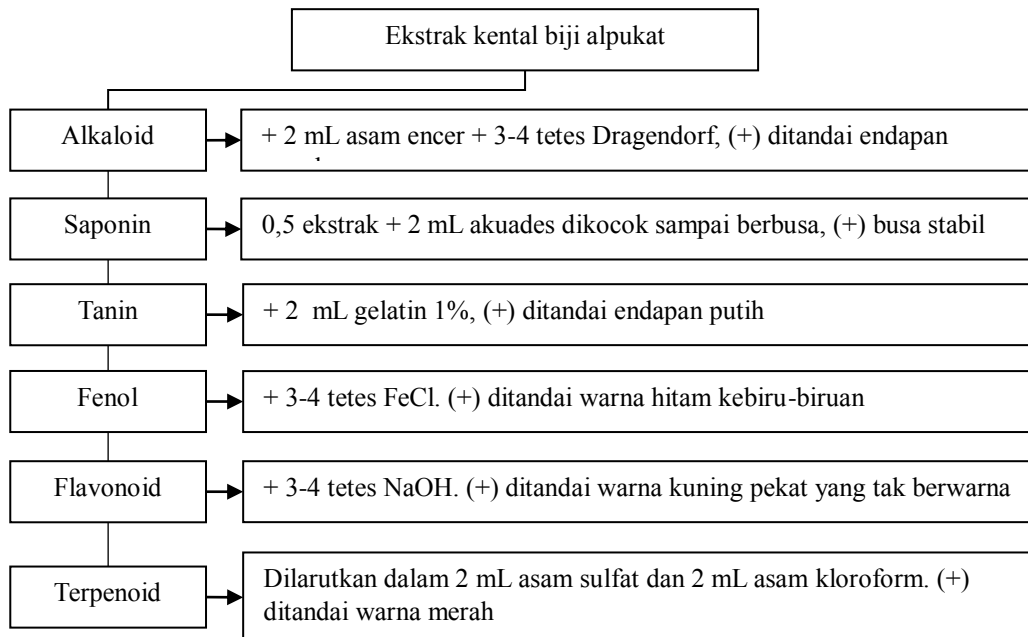
I. Alur Penelitian



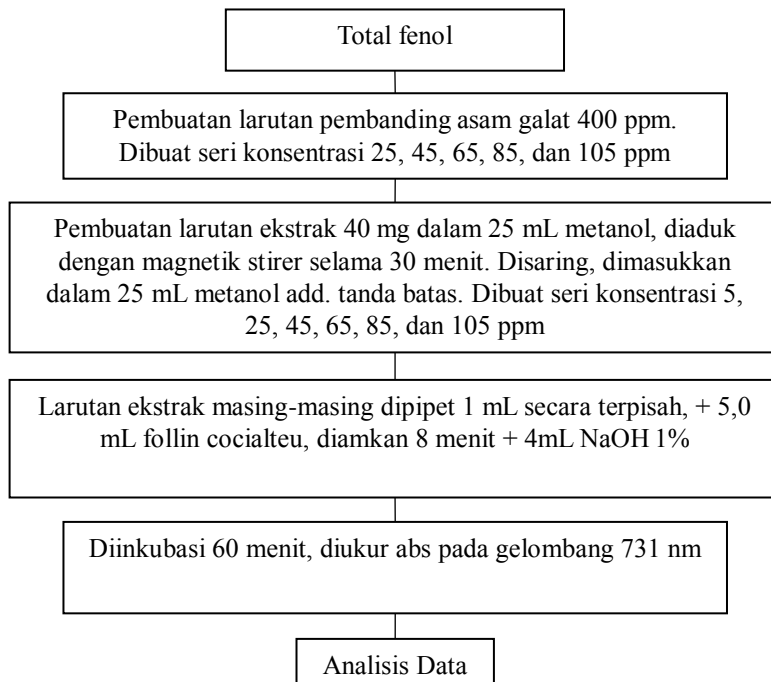
Gambar 7. Pembuatan ekstrak



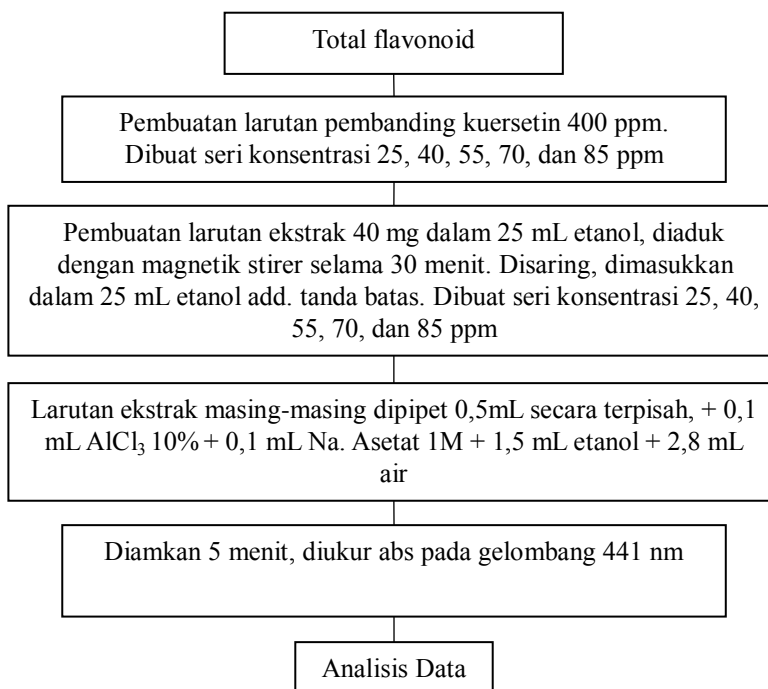
Gambar 8. Perlakuan ekstrak



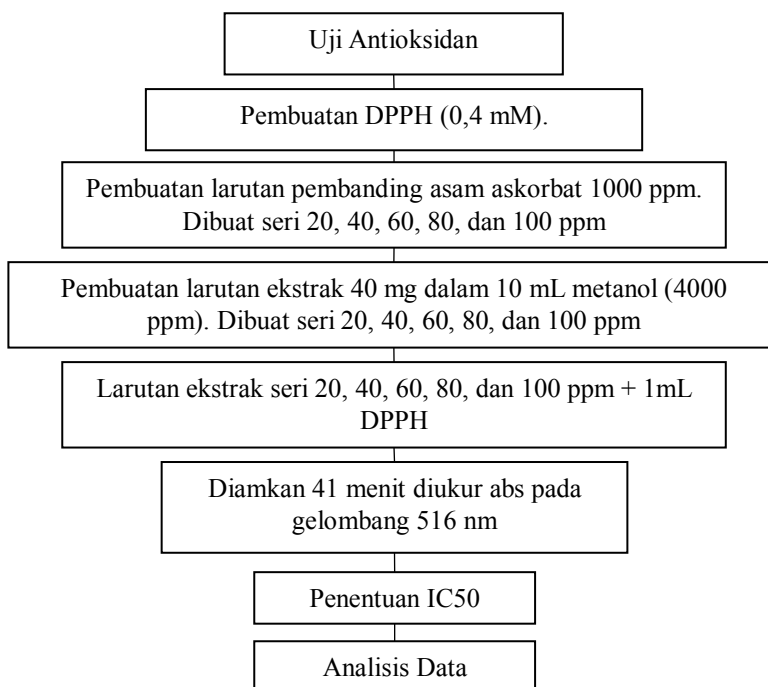
Gambar 9. Skrining fitokimia



Gambar 10. Penentuan total fenol



Gambar 11. Penentuan Total Flavonoid



Gambar 12. Uji Aktivitas Antioksidan