

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi yaitu seluruh objek sebagai sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alpukat dan bunga rosela yang diperoleh dari petani Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yaitu sebagian kecil dari populasi yang digunakan sumber informasi untuk mengumpulkan seluruh data yang dibutuhkan dalam jawaban pertanyaan atau masalah dalam penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun alpukat dalam keadaan segar, dengan warna hijau tua, tidak memiliki penyakit, tidak mengalami pembusukan dan bunga rosela berwarna merah, tidak layu, kelopak bunga segar, berwarna merah pekat. Pengambilan sampel keduanya dilakukan secara acak pada saat pengumpulan bahan.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% daun alpukat dan bunga rosela, serta Variabel utama kedua yaitu aktivitas antioksidan kombinasi.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama terdiri dari seluruh variabel yang akan diteliti langsung. Variabel yang diamati bisa dikelompokkan pada beberapa bentuk variabel bebas, variabel terkendali, serta variabel tergantung/terikat.

Variabel bebas adalah variabel yang dilakukan perubahan agar bisa melihat pengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang diterapkan ialah variasi kombinasi esktrak daun alpukat dan bunga rosela dengan perbandingan

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat berpengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu bahan dan alat yang digunakan, kondisi laboratorium dan lingkungan.

Variabel tergantung adalah variabel yang bisa berubah karena berubahnya variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini

adalah persen peredaman radikal bebas dari ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dan bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) .

3. Definisi operasional variabel

Pertama, daun alpukat adalah daun yang masih segar, tidak rusak, serta dalam kondisi baik yang dipilih dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, bunga rosela adalah bunga rosela berwarna merah, tidak layu, kelopak bunga segar, berwarna merah pekat segar yang dipilih dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Ketiga, simplisia daun alpukat adalah daun alpukat yang telah melewati beberapa tahapan seperti tahapan sortasi basah, perajangan, pencucian, serta pengeringan.

Keempat, simplisia bunga rosela adalah bunga rosela yang telah melewati beberapa tahapan seperti tahap sortasi basah, perajangan, pencucian, serta pengeringan

Kelima, serbuk daun alpukat yaitu serbuk daun alpukat yang diperoleh dari hasil pengeringan dioven dengan suhu 50°C, penggilingan, dan pengayakan dengan ayakan No 40 dimasukkan pada wadah yang tertutup rapat serta tersimpan pada suhu kamar.

Keenam, serbuk kelopak bunga rosela adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan dioven dengan suhu 50°C, penggilingan, dan pengayakan dengan pengayak dengan ayakan No 40 dimasukkan pada wadah yang tertutup rapat serta tersimpan pada suhu kamar.

Ketujuh, ekstrak daun alpukat adalah hasil dari maserasi serbuk daun alpukat dengan pelarut etanol 70%.

Kedelapan, ekstrak bunga rosela adalah hasil dari maserasi serbuk bunga rosela dengan pelarut etanol 70%.

Kesembilan, kombinasi (1:1) adalah campuran ekstrak daun alpukat dan ekstrak bunga rosela dengan penimbangan ekstrak daun alpukat sebanyak 25 mg dicampur ekstrak bunga rosela sebanyak 25 mg dengan pelarut etanol.

Kesepuluh, kombinasi (2:1) adalah campuran ekstrak daun alpukat dan ekstrak bunga rosela dengan penimbangan ekstrak daun alpukat sebanyak 33,33 mg dicampur ekstrak bunga rosela sebanyak 16,67 mg dengan pelarut etanol.

Kesebelas, kombinasi (1:2) adalah campuran ekstrak daun alpukat dan ekstrak bunga rosela dengan penimbangan ekstrak daun

alpukat sebanyak 16,67 mg dicampur ekstrak bunga rosela sebanyak 33,33 mg dengan pelarut etanol.

Keduabelas, aktivitas antioksidan adalah aktivitas antioksidan yang dihasilkan dari ekstrak daun alpukat dan bunga rosela tunggal beserta kombinasinya dengan metode DPPH.

Ketigabelas, IC₅₀ adalah nilai yang menunjukkan ekstrak daun alpukat dan bunga rosela yang dapat memberikan hambatan 50% aktivitas radikal bebas.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu gunting, pisau, blender, saringan, timbangan digital, oven (Menmert), beaker glass Pyrex®, labu takar Pyrex®, Erlenmeyer Pyrex®, spektrofotometer UV Vis, ayakan no 40, pipet tetes, kuvet, tabung, rak tabung, vial coklat, mikropipet, alumunium foil, labu destilasi.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun alpukat (*Persea americana* Mill.), etanol 70%, kuersetin, etanol *p.a*, serbuk DPPH, bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*), serbuk Mg, FeCl₃ asam klorida.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dan bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*)

Tahap pertama penelitian ini adalah memastikan kebenaran sampel yang digunakan sesuai yang berkaitan dengan ciri-ciri serta bentuk morfologinya. Identifikasi daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dan bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu.

2. Pengambilan dan pemilihan bahan serta pembuatan serbuk daun alpukat dan bunga rosela

Daun alpukat dan bunga rosela diperoleh dari daerah Tawangmangu. Daun alpukat dan bunga rosela dilakukan sortasi basah dengan cara dibersihkan dari kotoran yang ada, yaitu tanah, pasir, debu dll. Dilakukan pencucian menggunakan air yang mengalir sampai bersih, kemudian tiriskan. Daun alpukat dan bunga rosela dikeringkan di oven

dengan suhu 50°C hingga kering atau menggunakan pemanasan dibawah sinar matahari. Pengeringan dilakukan bertujuan untuk mengurangi kadar air ada simplisia sehingga bisa menghindari proses pembusukan oleh mikroorganisme. Simplisia dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan no 40.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun alpukat dan bunga rosela

Penetapan susut pengeringan daun alpukat dan bunga rosela dilakukan dengan menimbang masing-masing 2 gram serbuk, kemudian diletakkan pada alat *moisture balance* di suhu 105°C dalam waktu 5 menit, ditunggu hingga tanda alarm/ bunyi pada alat dan menunjukkan angka konstan dalam % (Depkes 2000).

4. Pembuatan ekstrak daun alpukat dan bunga rosela

Serbuk simplisia daun alpukat dan bunga rosela yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol perbandingan 1 g serbuk simplisia berbanding 10 bagian pelarut (Kemenkes RI, 2017). Proses ekstraksi dilakukan melalui pengadukan sesekali saat 6 jam pertama, lalu didiamkan selama 18 jam (Chandra *et al.*, 2022). Hasil ekstrak cair disaring menggunakan kain flannel dan kertas saring kemudian dipekatkan melalui *rotary evaporator* sampai memperoleh ekstrak kental.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot awal simplisia yang ditimbang}} \times 100$$

5. Penetapan Organoleptis ekstrak

Penetapan organoleptis ekstrak daun alpukat dan bunga rosela dilakukan dengan mengamati atau melihat warna, bentuk, serta bau ekstrak menggunakan panca indra manusia.

6. Skrining fitokimia ekstrak daun alpukat dan bunga rosela

6.1 Uji Flavonoid. Sebanyak 1 ml ekstrak ditambah HCl pekat sejumlah 2 tetes dan dikocok kuat, diberikan serbuk Mg kemudian untuk selanjutnya dikocok kuat. Sampel positif apabila warna berubah menjadi jingga (Huliselan *et al.*, 2015). Lakukan dengan cara yang sama untuk bunga rosela.

6.2 Uji Fenol. Ekstrak diambil 1 ml, dimasukkan besi (III) klorida 1% (yang telah encer) 2 sampai 3 tetes. Sampel positif jika terbentuk warna hijau kebiruan atau gelap (Endarini, 2016).

6.3 Uji Saponin. Diambil 1 ml ekstrak dimasukkan lalu ditambahkan 5 ml air panas serta 2 tetes HCl 2N selanjutnya dikocok

kuat. Kemudian, diamati apakah terbentuk buih sesudah dilakukan pendiaman dalam waktu 10 menit. Sampel positif memiliki saponin jika ada buih dan intensitas yang besar serta konsisten dalam waktu 10 menit (Huliselan *et al.*, 2015).

6.4 Uji Tanin. Ekstrak diambil sebanyak 1 mL lalu ditambah FeCl₃ sejumlah 3 tetes. Sampel positif memiliki warna hijau atau biru kehitaman (Bahriul *et al.*, 2014).

7. Persiapan Larutan DPPH

7.1 Pembuatan larutan DPPH. Serbuk DPPH ditimbang dengan berat 15,8 mg dan diletakkan pada labu ukur 100 ml. Serbuk dilarutkan dengan etanol sampai tanda batas labu ukur (Wulandhari, 2022).

7.2 Pembuatan larutan uji. Ditimbang ekstrak daun alpukat tunggal, bunga rosela tunggal dan kombinasi (1:1), (2:1) dan (1:2) dilarutkan dengan etanol di labu ukur dengan konsentrasi 500 ppm. Dilakukan pengenceran dengan variasi konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Ditambahkan etanol sampai tanda batas, dikocok sampai homogen.

7.3 Pembuatan larutan kuersetin. Kuersetin ditimbang 10 mg dan dilarutkan menggunakan etanol p.a hingga 100 mL sehingga diperoleh 100 ppm. Larutan stok dibuat 5 seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm serta 10 ppm. Etanol ditambahkan secukupnya sampai tanda batas dan didapat konsentrasi 100 ppm (Munadi, 2020).

7.4 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH. Diambil 1 mL larutan DPPH, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan aquades sampai tanda batas. Kemudian digojokkan sampai homogen serta diamati absorbansi dalam panjang gelombang 500-600 nm (Bainunniza, 2022).

7.5 Penetapan operating time (OT). Larutan DPPH 1 mL diambil dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, diberikan aquades sampai tanda batas, digojok sampai homogen dalam waktu 1 menit serta pengukuran absorbansi dalam menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 dalam panjang gelombang maksimal yang sudah didapat sampai didapatkan absorbansi yang stabil serta tidak ada penurunan absorbansi (Bainunniza, 2022).

7.6 Pengujian aktivitas antioksidan. Larutan uji masing-masing dipipet sejumlah 1 mL lalu ditambahkan pereaksi DPPH sebanyak 1 mL serta 3 mL etanol p.a dimasukkan dalam flakon. Serapan

dihitung melalui spektrofotometer UV-Vis dalam panjang gelombang maksimal.

7.7 Analisis Hasil. Nilai absorbansi yang muncul pada pengujian aktivitas antioksidan sampel, dihitung nilai serapan larutan DPPH sebelum dan setelah ditambahkan ekstrak dihitung menjadi persen peredaman. Perhitungan persentase peredaman radikal bebas DPPH menggunakan rumus:

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

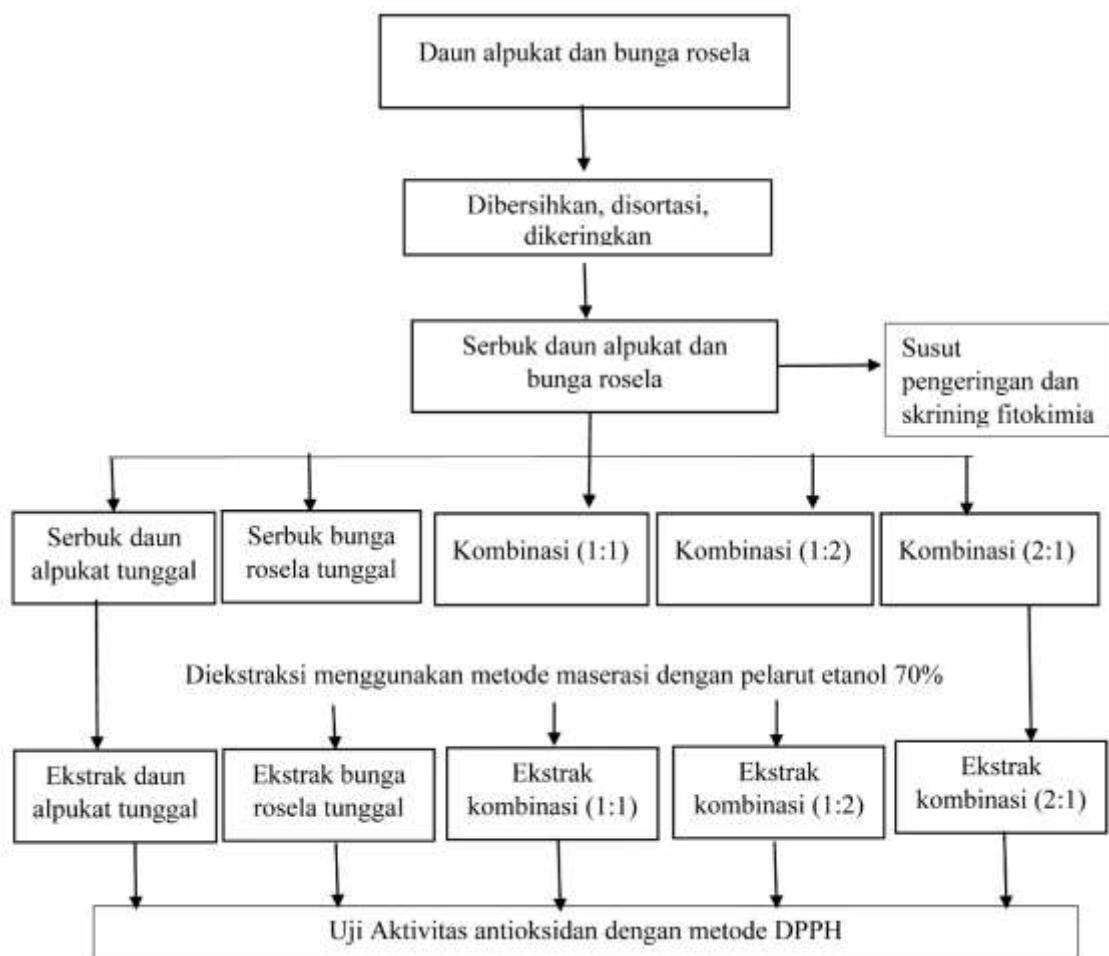
Keterangan:

Abs kontrol: Absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan etanol

Abs sampel: Absorbansi ekstrak daun alpukat tunggal, bunga rosela tunggal beserta kombinasinya setelah direaksikan dengan DPPH.

Hasil data yang diperoleh diolah menggunakan SPSS versi 25. Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH ditampilkan dalam bentuk nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ didapatkan dari persamaan regresi linier penghambatan radikal DPPH dengan rumus $y = ax + b$. Perbedaan aktivitas antioksidan ekstrak dilihat dengan melakukan uji Mann Whitney.

E. Skema Penelitian



Gambar 3 Skema Penelitian