

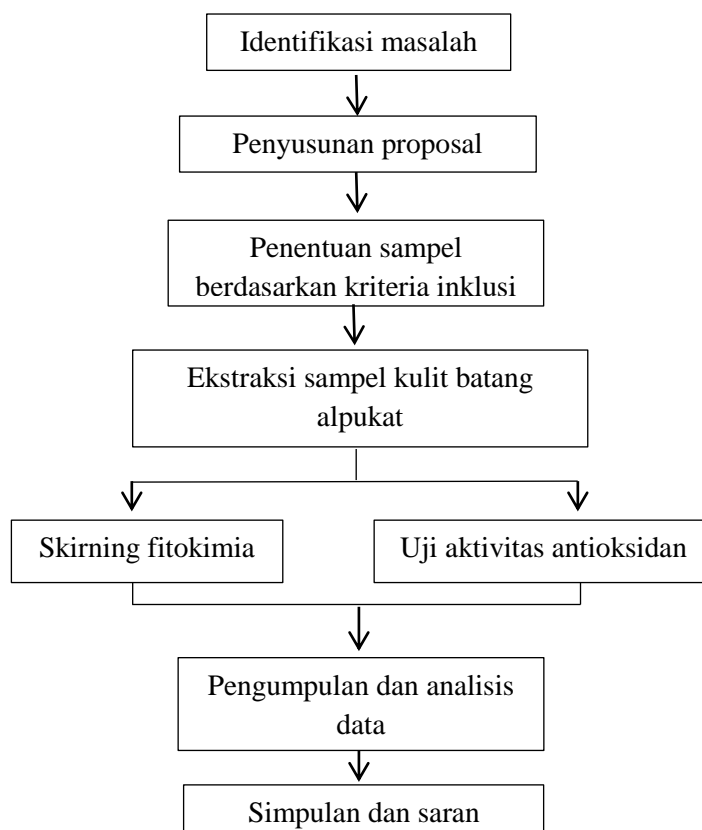
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif yaitu penelitian yang menentukan nilai satu atau lebih variabel independen, tanpa perbandingan atau atau menghubungkan dengan variabel yang lain, menurut (Sugiyono (2018). Dalam penelitian ini data dianalisis dengan cara mendeskripsikan atau menggambarkan kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidan sebagai mana adanya.

B. Alur penelitian



Gambar 4 Bagan Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel kulit batang alpukat dilakukan dari pohon warga di Desa Nyambu, Kediri, Tabanan. Pemeriksaan skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Waktu yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pada bulan Februari sampai April 2023

D. Sampel Penelitian

1. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang alpukat yang diolah dengan metode maserasi. Kriteria inklusi dari kulit batang alpukat yang akan digunakan adalah kulit batang yang berwarna hijau tua sampai coklat, dan tidak berlubang. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu, kulit batang berwarna hijau muda, busuk, dan berlubang. Sehingga dalam penelitian ini menggunakan sampel yang memenuhi kriteria inklusi.

2. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit batang alpukat.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data yang Dikumpulkan

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengumpulan data primer dan data sekunder. Menurut Danang Sunyoto (2013:21), data primer adalah data asli yang dikumpulkan oleh peneliti sendiri untuk secara khusus menjawab masalah penelitiannya, dan data sekunder adalah informasi yang berasal dari catatan perusahaan yang ada dan sumber lain.

Dalam penelitian ini yang termasuk data primer adalah hasil yang didapat dari skrining fitokimia dan antioksidan ekstrak etanol kulit batang alpukat. Sedangkan data sekunder dalam penelitian ini didapat dari sumber literature yang terkait dengan penelitian ekstrak etanol kulit batang.

2. Cara Pengumpulan Data

Cara pengumpulan data pada penelitian ini adalah dengan cara melakukan percobaan uji laboratorium dengan cara menganalisis kandungan fitokimia secara kualitatif dan uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif pada ekstrak etanol kulit batang alpukat menggunakan metode *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH) pada spektrofotometer.

3. Instrumen Pengumpulan Data

Instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data pada penelitian ini adalah:

- a. Alat tulis
- b. Pisau
- c. Kamera
- d. Alat dan bahan untuk skrining fitokimia, dan aktivitas antioksidan

1) Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri timbangan duduk, blander (*getra*), neraca analitik (*Radwag*), batang pengaduk, pipet tetes, pipet ukur (*Iwaki pyrex*), *ball pipet*, tabung reaksi (*Iwaki*), labu takar (*Iwaki pyrex*), *beaker glass*, rak tabung, *rotary evaporator (buchi)*, toples, corong dan *spektofotometer UV-vis*.

2) Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang alpukat, asam sulfat, pereaksi dragendorff (*Merck*), pereaksi mayer wagner (*Merck*), serbuk magnesium (Mg), asam sulfat (H₂SO₄) pekat (*Smartlab*), asam klorida (HCl) 2 N (*Smartlab*), asam klorida (HCL) pekat, asam asetat anhidrida, Besi (III) Klorida (FeCl₃) 1% (*Merck*), serbuk DPPH (*E merck*), etanol 70%, kertas saring (*Whatman*), tisu dan aluminium foil.

3) Prosedur kerja

a) Pengambilan sampel

Sampel kulit batang alpukat diambil dari pohon warga di Desa Nyambu, Kecamatan Kediri, Kabupaten Tabanan. Kulit batang alpukat yang digunakan berwarna hijau tua sampai coklat, dan tidak berlubang.

b) Pembuatan serbuk simplisia

Kulit batang alpukat yang telah didapatkan ditimbang kulit batang yang masih segar sebanyak 2 kg dan disortasi basah dengan mencucinya di air mengalir, selanjutnya kulit batang alpukat dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering kulit batang alpukat kembali disortasi yang bertujuan untuk memisahkan sampel dari bahan-bahan yang ikut tercampur dalam

proses pengeringan, selanjutnya haluskan kulit batang alpukat dengan cara di blander atau ditumbuk kemudian ditimbang berat keringnya.

c) Ekstraksi

Sampel kulit batang alpukat yang telah dikeringkan dan dihaluskan sehingga didapat serbuk simplisia. Serbuk simplisia kulit batang alpukat di ekstrak dengan metode remaserasi menggunakan perbandingan simplisia dengan pelarut 1:5. Sebanyak 594 gram serbuk simplisia kulit batang alpukat direndam dengan pelarut etanol 70% sebanyak 2000 ml kemudian ditutup menggunakan aluminium foil dan diamkan selama 2 hari. Setelah 2 hari dilakukan penyaringan filtrat, residu yang diperoleh kembali diekstraksi secara remaserasi dengan cara yang sama dan diamkan selama 2 hari. Setelah 2 hari, etanol dan ampas kulit batang alpukat kembali disaring, lakukan hal yang sama kemudian simpan selama 3 hari. Setelah disimpan selama 3 hari maserat dituang dan disaring Hasil maserat kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 50°C, hingga diperoleh ekstrak kental. (Fitriyanti, Qalbiyah dan Sayakti, 2020). Ekstrak kental tersebut ditimbang dan dihitung rendemen ekstrak kentalnya menggunakan rumus :

$$Rendemen = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

d) Skrining Fitokimia

(1) Uji alkaloid

Pengujian Alkaloid dilakukan dengan cara melarutkan sejumlah ekstrak dengan larutan HCl kemudian disaring dan filtrat yang diperoleh dibagi ke 2 tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai blanko, dan tabung kedua

ditambahkan pereaksi wagner sebanyak 3 tetes, reaksi positif adanya alkaloid ditandai dengan terbentuk endapan cokelat pada tabung kedua.

(2) Uji flavonoid

Pengujian flavonoid dilakukan dengan menambahkan 1 ml sampel dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan bubuk magnesium sekucupnya dan asam klorida pekat sebanyak 10 tetes. Reaksi positif adanya flavonoid ditandai dengan warna sampel kuning hingga jingga. (Asniati dan Muthmainnah, 2021)

(3) Uji saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan cara memasukkan 2 ml ekstrak etanol kulit batang alpukat ditambahkan 10 ml air panas ke dalam tabung reaksi. Setelah itu didingin dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm kurang lebih selama 5 menit dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2 N maka menandakan positif adanya saponin (Asniati dan Muthmainnah, 2021)

(4) Uji steroid

Pengujian steroid dilakukan dengan memasukkan ekstrak etanol kulit batang alpukat sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrida dan 2 tetes asam sulfat pekat. Reaksi positif adanya steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hijau (Puspitasari, 2019).

(5) Uji tanin

Pengujian tanin dilakukan dengan memasukkan ekstrak kulit batang alpukat sebanyak 2 ml ke dalam tabung reaksi dan diberikan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Reaksi positif adanya tanin ditandai dengan sampel berubah

menjadi hitam kebiruan atau hijau kehitaman (Asniati dan Muthmainnah, 2021)

e) Uji aktivitas antioksidan

(1) Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM (40 ppm)

Sebanyak 4 mg serbuk DPPH ditimbang kemudian dilarutkan dengan metanol p.a, dimasukkan ke dalam 100 mL labu ukur gelap, dan tambahkan pelarut hingga tanda batas kemudian dihomogenkan dengan cara dikocok. Simpan ditempat gelap untuk meminimalkan degradasi. (Alfira, 2014)

(2) Panjang gelombang maksimum

Sebanyak 2,0 mL larutan DPPH 0,1 mM dipipet dan ditambahkan metanol pa sebanyak 2,0 mL. Selanjutnya tutup dengan alumunium foil dan homogenkan. Diamkan selama 30 menit dalam gelap dan ukur absorbansi pada panjang gelombang 517 nm. Panjang gelombang maksimum diperoleh dari panjang gelombang yang memiliki absorbansi maksimum. (Alfira, 2014)

(3) Pembuatan larutan induk ekstrak

Sebanyak 100 mg ekstrak etanol kulit batang alpukat (*Persea americana Mill.*) kemudian dilarutkan dengan etanol 70% pada labu ukur 100 ml dicukupkan hingga tanda batas (konsentrasi 1000 ppm). Selanjutnya dibuat seri masing-masing konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, dan 125 ppm dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran, yaitu: $M1.V1 = M2.V2$. Masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml dan tambahkan etanol hingga tanda batas (Alfira, 2014).

(4) Uji aktivitas antioksidan

(a) Absorbansi kontrol dengan mengambil 1 ml larutan DPPH dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan etanol sebanyak 3 ml setelah itu dihomogenkan dan tutup tabung reaksi dengan aluminium foil agar tidak terkontaminasi dengan udara luar, selanjutnya inkubasi di suhu ruang selama 30 menit, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan *spektrofotometer Uv-vis*.

(b) Absorbansi sampel ekstrak etanol kulit batang alpukat dilarutkan dalam pelarut etanol dengan variasi konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, dan 125 ppm. Variasi konsentrasi tersebut dihitung dengan menggunakan rumus: $M_1V_1=M_2V_2$. Masing-masing variasi diambil sebanyak 3 ml sampel dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan DPPH sebanyak 1 ml ke dalam masing-masing variasi dan dihomogenkan. Kemudian tutup tabung reaksi dengan aluminium foil agar tidak terkontaminasi dengan udara luar, lalu dinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit (Ibrahim, 2014)

(5) Penentuan persen inhibisi, dan nilai *Inhibition Concentration* (IC_{50})

Persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan uji dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100$$

Sedangkan perhitungan nilai IC_{50} adalah konsentrasi dimana ekstraknya dapat menghilangkan radikal bebas sebesar 50% yang diperoleh menggunakan persamaan regresi linier $y = a + bx$. Persamaan tersebut

digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dari masing-masing sampel. (Alfira, 2014)

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Pengolahan data penelitian skrining fitokimia dilakukan dengan cara analisis deskriptif yaitu menjelaskan kandungan senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan tanin yang terdapat pada air ekstrak etanol kulit batang alpukat. Sedangkan pengolahan data untuk menentukan aktivitas antioksidan metode DPPH dihitung menggunakan rumus

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100$$

Nilai IC₅₀ diperoleh dengan melihat kurva garis yang melewati titik 50% daya hambat pada sumbu konsentrasi, dengan menggunakan persamaan $y=ax + b$, dimana $y=50$ dan x adalah konsentrasi larutan uji yang akan dicari untuk mengetahui berapa besar konsentrasi yang mampu menghambat 50% larutan radikal bebas

2. Analisis data

Analisis data pada hasil skrining fitokimia akan dianalisis secara deskriptif kualitatif dengan menjabarkan kandungan senyawa metabolit sekunder yang didapat pada ekstrak etanol kulit batang alpukat. Sedangkan aktivitas antioksidan akan dianalisis secara deskriptif kuantitatif yang disajikan dalam bentuk tabel dan dijabarkan hasilnya berdasarkan intensitas nilai IC₅₀.

G. Etika Penelitian

Prinsip etika penelitian yang diterapkan pada penelitian ini adalah beneficence yaitu prinsip yang mengutamakan tindakan yang ditujukan untuk memberikan manfaat yang baik kepada orang lain (Karjoko, Rosidah dan Rahmi Handayani, 2020)