

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah daun sirsak yang berasal dari tanaman sirsak yang ditanam di Boyolali, Jawa Tengah dan daun alpukat dari tanaman alpukat yang ditanam di Tawangmangu Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak dari tanaman sirsak yang tumbuh dipekarangan, diambil di Boyolali Jawa Tengah, dan daun alpukat dari tanaman alpukat, diambil di Tawangmangu Karanganyar Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi dalam penelitian adalah aktivitas antioksidan dari kombinasi fraksi *n*-heksana daun sirsak dan fraksi etil asetat daun alpukat terhadap radikal bebas DPPH.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi fraksi *n*-butanol daun sirsak dan fraksi etil asetat daun alpukat dalam berbagai perbandingan.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah konsentrasi radikal bebas, alat, kualitas bahan, dan penetapan waktu kestabilan serapan.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan kombinasi fraksi *n*-butanol daun sirsak dan fraksi etil asetat daun alpukat dalam meredam radikal DPPH.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirsak (*Annona muricata* L.) adalah daun yang memiliki ciri berbentuk bulat panjang, daun menyirip, berwarna hijau muda sampai hijau tua, dalam satu bunga terdapat banyak putik sehingga dinamakan bunga berpistil majemuk.

Kedua, daun alpukat (*Persea americana* Mill) adalah daun tunggal, letaknya berdesakan di ujung ranting yang memiliki ciri berbentuk jorong sampai bundar telur memanjang, tebal seperti kulit, ujung dan pangkal runcing, bertulang menyirip, daun muda berwarna kemerahan dan berambut rapat, daun tua berwarna hijau gundul.

Ketiga, ekstrak metanol daun sirsak dan daun alpukat adalah ekstrak yang diperoleh dari ekstrak serbuk daun sirsak dan daun alpukat menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol kemudian diuapkan sampai pekat.

Keempat, fraksi *n*-butanol adalah bagian *n*-heksana dari hasil fraksinasi ekstrak metanol dengan *n*-butanol dari daun sirsak yang dipekatkan sampai kering.

Kelima, fraksi etil asetat adalah lapisan etil asetat yang diambil dari hasil fraksinasi antara etil asetat dengan lapisan berair sisa partisi dengan *n*-heksana dari daun alpukat yang dipekatkan sampai kering.

Keenam, DPPH adalah radikal bebas sintetik yang stabil dalam larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol.

Ketujuh, antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron pada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam.

Kedelapan, potensi aktivitas antioksidan adalah aktivitas yang ditimbulkan dari beberapa perbandingan kombinasi fraksi *n*-butanol daun sirsak dan fraksi etil asetat daun alpukat terhadap radikal bebas DPPH dengan parameter berdasarkan nilai IC_{50} .

Kesembilan, IC_{50} adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%, semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidan dari ekstrak.

Kesepuluh, tingkat kekuatan antioksidan dikategorikan sangat kuat apabila nilai $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$; dikategorikan kuat apabila memiliki nilai $IC_{50} 50\text{-}100 \mu\text{g/mL}$; dikategorikan sedang apabila memiliki nilai $IC_{50} 100\text{-}250 \mu\text{g/mL}$; dikategorikan lemah apabila memiliki nilai $IC_{50} 250\text{-}500 \mu\text{g/mL}$; dan dikategorikan tidak aktif apabila memiliki nilai $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$.

C. Bahan dan Alat

Bahan dalam penelitian ini adalah daun sirsak, daun alpukat, *n*-butanol, *n*-heksana, etil asetat, metanol teknis, metanol pro analisa, Vitamin C, aquadest, HCl pekat, amil alkohol, larutan besi (III) klorida 10%, larutan besi (III) klorida 10%, serbuk magnesium, DPPH dari Sigma[®].

Alat yang digunakan adalah bejana maserasi, blender, corong *Buchner* dan *vacuum rotary evaporator*, oven, spektrofotometri UV-Vis, timbangan analitik, kuvet, labu ukur, moisture balance, waterbath, pipet volume, kain flanel, alat penggiling, ayakan ukuran 40 mesh, kertas saring, dan alat gelas lainnya.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman sirsak dan alpukat

Tahap pertama pada penelitian ini adalah dengan memastikan kebenaran tanaman sirsak dan tanaman alpukat berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman sirsak dan alpukat. Tanaman sirsak dan alpukat yang akan diteliti dideterminasi terlebih dahulu di laboratorium biologi fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret.

2. Persiapan bahan

Daun sirsak dan daun alpukat yang digunakan adalah daun yang masih segar dan dipetik secara acak. Daun yang dipanen dilakukan penyortiran kemudian ditimbang masing-masing sebanyak 5,0 kg lalu dicuci dengan air kemudian dilakukan proses perajangan lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C.

3. Pembuatan serbuk

Daun sirsak dan daun alpukat yang sudah dikeringkan dijadikan sediaan serbuk dengan cara digiling. Serbuk daun sirsak dan daun alpukat diayak dengan menggunakan pengayak ukuran 40 mesh. Hasil penyerbukan disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat.

1. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk daun sirsak dan daun alpukat dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk daun sirsak dan daun alpukat dimasukkan sebanyak 2,0 gram pada suhu 105°C ditunggu sampai nilai susut pengeringan muncul pada alat dalam satuan persen (%) terhadap bobot awal.

2. Pembuatan ekstrak

2.1. Pembuatan ekstrak metanol daun sirsak. Ekstrak etanolik dibuat dengan cara menimbang 500,0 gram serbuk daun sirsak kemudian serbuk dimasukkan dalam botol maserasi ditambah 3.750 mL metanol perbandingan 1:7,5 yaitu 1 bagian simplisia dimasukkan dalam 7,5 bagian cairan penyari kemudian didiamkan selama 5 hari dengan penggojokan 3x sehari. Setelah lima hari maserat disaring dengan kain flanel dan kertas saring. Ampas dibilas dengan 1.250 mL metanol kemudian ekstrak dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai pelarut metanol habis, selanjutnya disebut ekstrak metanol daun sirsak.

2.2. Pembuatan ekstrak metanol daun alpukat. Ekstrak etanolik dibuat dengan cara menimbang 500,0 gram serbuk daun alpukat kemudian serbuk dimasukkan dalam botol maserasi ditambah 3.750 mL metanol perbandingan 1:7,5 yaitu 1 bagian simplisia dimasukkan dalam 7,5 bagian cairan penyari kemudian didiamkan selama 5 hari dengan penggojokan 3x sehari. Setelah lima hari maserat disaring dengan kain flanel dan kertas saring. Ampas dibilas dengan 1.250 mL metanol kemudian ekstrak dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai pelarut metanol habis, selanjutnya disebut ekstrak metanol daun alpukat.

3. Pembuatan fraksi

3.1. Pembuatan fraksi *n*-butanol daun sirsak. Ekstrak metanol pekat dari daun sirsak yang didapat diambil 10,0 gram dilarutkan dengan 10 mL metanol diaduk sampai larut dan ditambah 65 mL air, kemudian difraksinasi dengan *n*-heksana dilakukan sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah. Sari *n*-heksana selanjutnya dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan oven, sari *n*-heksana yang sudah pekat disebut ekstrak fraksi *n*-heksana.

Lapisan benar sisa partisi dengan *n*-heksana kemudian dipartisi lagi dengan 75 mL etil asetat sebanyak 3 kali. Lapisan etil asetat dipisahkan dan dipekatkan menggunakan oven dan diperoleh fraksi etil asetat.

Lapisan benar sisa partisi dengan etil asetat kemudian dipartisi lagi dengan 75 mL *n*-butanol sebanyak 3 kali. Lapisan *n*-butanol dipisahkan dan dipekatkan menggunakan oven dan diperoleh ekstrak fraksi *n*-butanol.

3.2. Pembuatan fraksi etil asetat daun alpukat. Ekstrak metanol pekat dari daun alpukat yang didapat diambil 10,0 gram dilarutkan dengan 10 mL metanol aduk sampai larut dan ditambah 65 mL air kemudian difraksinasi dengan *n*-heksana dilakukan sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah. Sari *n*-heksana selanjutnya dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan oven, sari *n*-heksana yang sudah pekat disebut ekstrak fraksi *n*-heksana.

Lapisan benar sisa partisi dengan *n*-heksana kemudian dipartisi lagi dengan 75 mL etil asetat sebanyak 3 kali. Lapisan etil asetat dipisahkan dan dipekatkan menggunakan oven dan diperoleh ekstrak fraksi etil asetat.

4. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia terhadap ekstrak etanolik daun sirsak dan daun alpukat meliputi pemeriksaan flavonoid, saponin, tanin, dan polifenol.

4.1. Pemeriksaan flavonoid. Ekstrak dan fraksi dari daun alpukat dan daun sirsak ditimbang sebanyak 1 gram kemudian ditambah dengan serbuk Mg, 0,2 ml HCL pekat, dan beberapa tetes amil alkohol. Larutan dikocok dan dibiarkan memisah. Reaksi dikatakan positif jika dibandingkan dengan larutan standart yang

jernih akan menunjukkan adanya warna merah/jingga/kuning pada amil alkohol (Yunita 2009).

4.2. Pemeriksaan saponin. 0,1 g ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 ml air hangat atau panas lalu dikocok selama 30 detik. Tes buih positif mengandung saponin bila terjadi buih yang stabil selama 30 menit dengan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan (Fitriyani *et al.* 2011).

4.3. Pemeriksaan tanin. Ekstrak dan fraksi dari daun alpukat dan daun sirsak ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dalam 10 ml air panas, kemudian disaring dan filtrat pada tabung reaksi ditambah besi (III) klorida 1%, reaksi positif jika menunjukkan dengan terbentuknya warna coklat dan biru kehitaman (Densita 2015).

5. Persiapan larutan

5.1. Larutan DPPH. Larutan pereaksi adalah larutan DPPH 40 ppm dalam pelarut metanol p.a. Dibuat dengan menimbang 4 mg serbuk DPPH kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml, setelah itu ditambah metanol p.a sampai tanda batas sehingga didapat konsentrasi 40 ppm.

5.2. Larutan stok vitamin C. Larutan baku pembanding yang digunakan adalah vitamin C. Dibuat dengan menimbang 10 mg vitamin C dilarutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml kemudian ditambah metanol p.a sampai tanda batas sehingga didapat konsentrasi 100 ppm dan selanjutnya dibuat 5 seri konsentrasi.

5.3. Larutan uji. Ditimbang sejumlah fraksi *n*-butanol daun sirsak dan ditambahkan fraksi etil asetat daun alpukat dengan perbandingan (1:1); (1:2); (2:1). Perbandingan 1:1 dibuat dengan menimbang 5 mg fraksi *n*-butanol daun sirsak dan 5,0 mg fraksi etil asetat daun alpukat, di larutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 mL, selanjutnya ditambah metanol p.a sampai tanda batas sehingga didapat konsentrasi 100 ppm. Perbandingan 1:2 dibuat dengan menimbang 5,0 mg fraksi *n*-butanol daun sirsak dan 10,0 mg fraksi etil asetat daun alpukat, dilarutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan ke dalam labu

ukur 150,0 mL, selanjutnya ditambah metanol p.a sampai 150,0 mL sehingga didapat konsentrasi 100 ppm. Perbandingan 2:1 dibuat dengan menimbang 10,0 mg fraksi *n*-butanol daun sirsak dan 5,0 mg fraksi etil asetat daun alpukat, di larutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan ke dalam labu ukur 150,0 mL, selanjutnya ditambah metanol p.a sampai 150,0 mL sehingga didapat konsentrasi 100 ppm, kombinasi ekstrak tersebut disebut dengan larutan stok kemudian dibuat 5 seri konsentrasi. Sebelum dilakukan pengujian terlebih dahulu ditetapkan panjang gelombang maksimal setelah itu ditetapkan *operating time*.

6. Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum larutan DPPH 40 ppm untuk uji aktivitas antioksidan fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air ekstrak etanolik dan rutin dilakukan sebagai berikut: 1,0 mL larutan DPPH 40 ppm ditambah 4,0 mL metanol p.a, kemudian dikocok dan diamati serapannya pada rentang 500-600 nm setelah pendiaman selama 30 menit.

7. Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara larutan stok DPPH 40 ppm diambil sebanyak 1,0 mL kemudian ditambah larutan ekstrak 4,0 ml. Penentuan *operating time* dilakukan sampai didapat absorbansi yang stabil, dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi. Penentuan *operating time* juga dilakukan padaa DPPH dengan vitamin C (Purwanto 2010).

8. Pengukuran serapan blangko

Pengukuran dilakukan dengan memipet 1,0 mL larutan DPPH 40 ppm, kemudian ditambahkan metanol p.a 4,0 mL. Campuran dikocok dan dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar pada blangko untuk vitamin C dan 25 menit pada blangko untuk sampel larutan uji kombinasi fraksi, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm.

9. Uji aktivitas antioksidan

Larutan stok kombinasi fraksi *n*-butanol daun sirsak dan fraksi etil asetat daun alpukat dibuat masing-masing 5 seri konsentrasi yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm.

Vitamin C digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) dengan perlakuan sama seperti kombinasi fraksi daun sirsak dan daun alpukat. Setiap konsentrasi larutan uji dipipet sebanyak 4,0 mL, kemudian ditambahkan 1,0 ml larutan pereaksi DPPH 40 ppm dalam flakon dan didiamkan selama 5 menit untuk vitamin C dan 25 menit untuk sampel larutan uji kombinasi fraksi. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah ditetapkan.

E. Analisis data

Absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan pada pengukuran aktivitas penangkap radikal bebas dari berbagai konsentrasi uji. Harga IC_{50} dihitung dari kurva regresi linier antara log konsentrasi ($\log C$) versus probit dari persen peredaman.

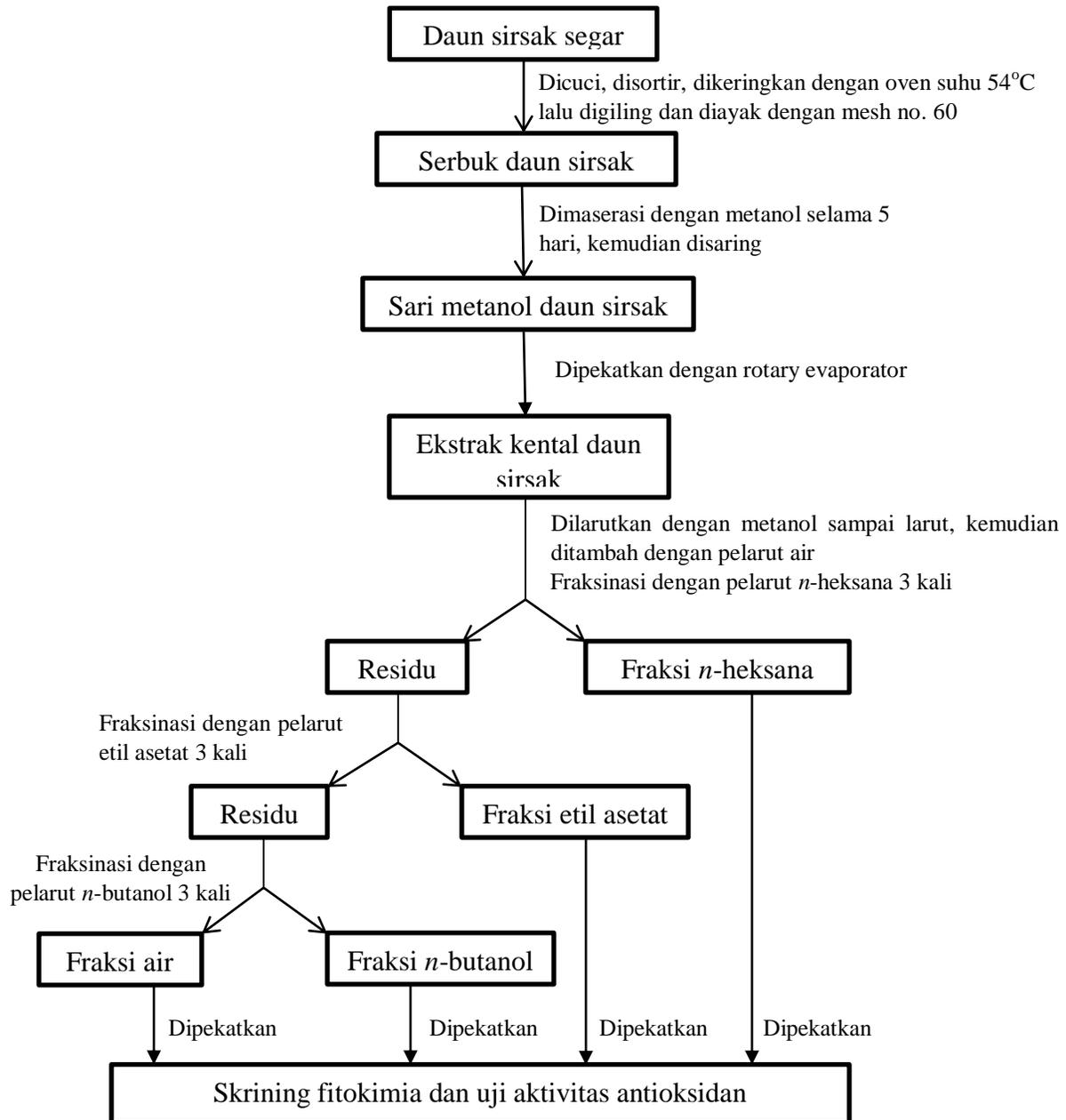
Aktivitas antioksidan dapat dilihat dari kekuatan menetralkan radikal DPPH. Aktivitas penangkap radikal bebas dari kombinasi fraksi *n*-heksana daun sirsak dan fraksi etil asetat daun alpukat serta pembanding vitamin C dinyatakan dengan harga IC_{50} yang ditentukan secara spektrofotometri UV-Vis. Hasil pengukuran absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung presentase aktivitas antioksidan dari berbagai konsentrasi uji. Harga IC_{50} dihitung dari persamaan regresi linear antara probit dan persen (%) peredaman radikal (% aktivitas) versus logaritma berbagai konsentrasi uji. Rumus prosentase peredaman sebagai berikut:

$$\text{peredaman (\%)} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Data hasil perhitungan IC_{50} kemudian dianalisis secara statistik menggunakan program (*Statistical Package for The Social Sciences*) SPSS 18. Uji normalitas menggunakan Kolmogorov-Smimov untuk mengetahui terdistribusi normal atau tidak, jika terdistribusi normal kemudian dilakukan analisis dengan menggunakan uji ANOVA., jika data tidak homogen kemudian dilakukan analisis dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.

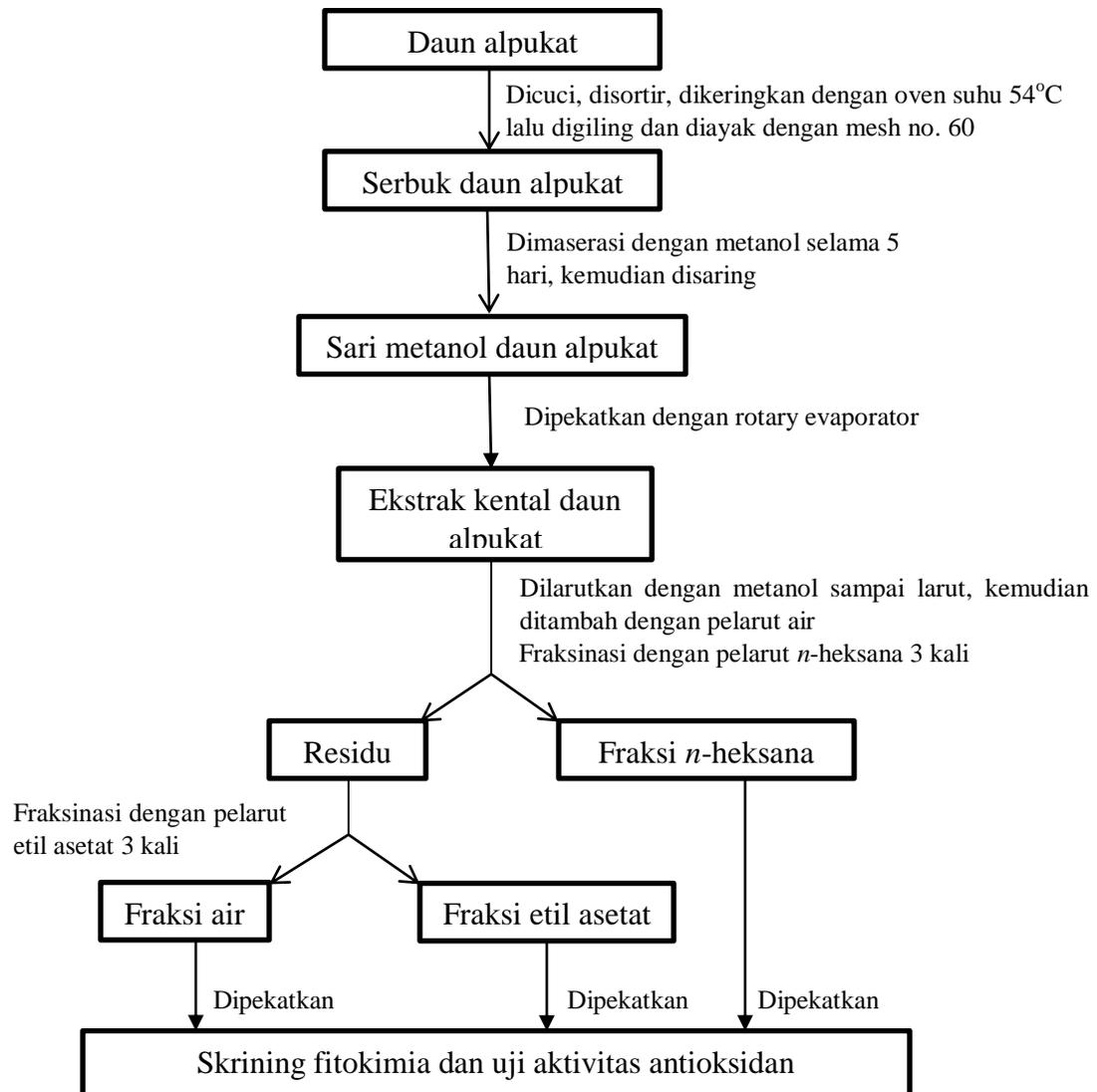
F. Skema Jalannya Penelitian

1. Skema pembuatan fraksi *n*-butanol daun sirsak



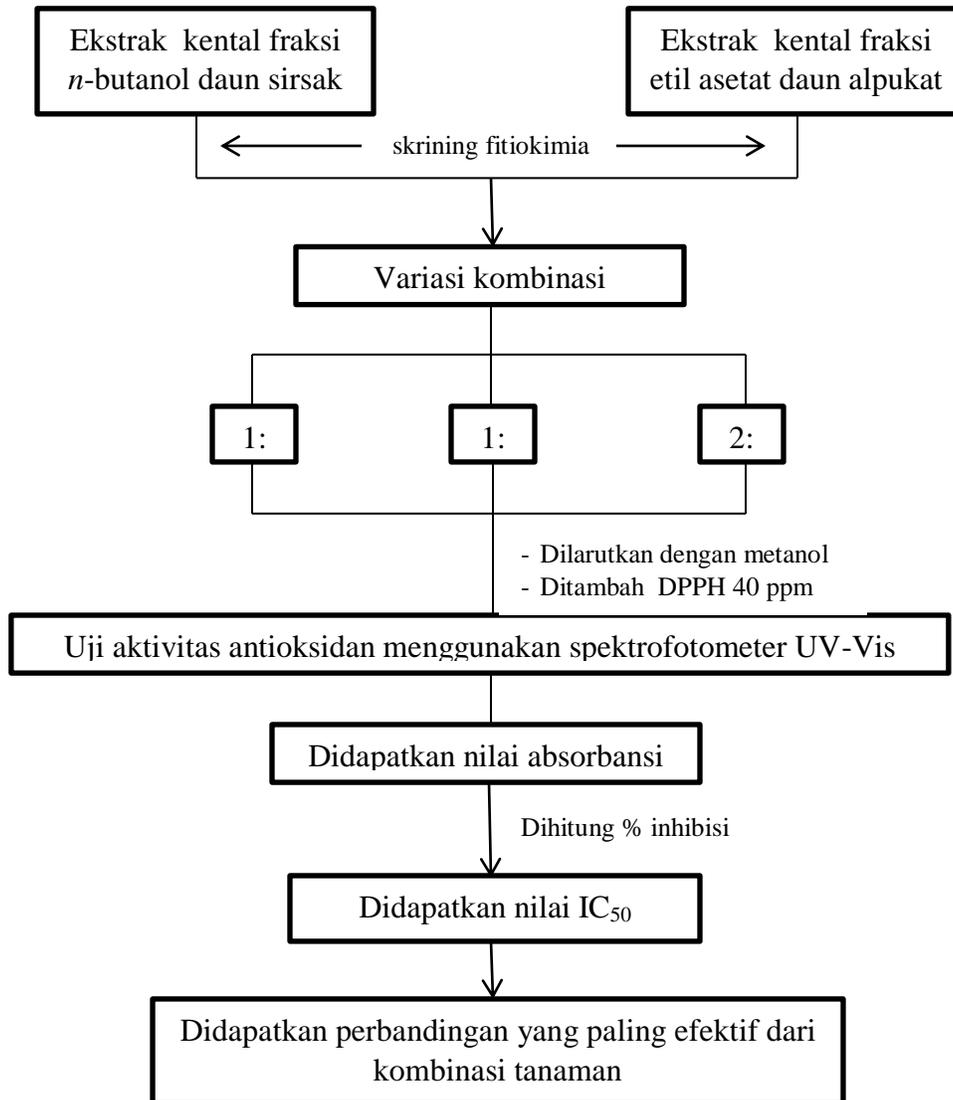
Gambar 10. Skema pembuatan fraksi *n*-butanol daun sirsak.

10. Skema pembuatan fraksi etil asetat daun Alpukat



Gambar 11. Skema pembuatan fraksi etil asetat daun alpukat.

11. Skema uji aktivitas antioksidan



Gambar 12. Skema uji aktivitas antioksidan.