

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen sesungguhnya (*true eksperiment*). Tujuan *true eksperiment* adalah untuk melihat akibat dari suatu perlakuan dengan cara membandingkan satu atau lebih kelompok pembanding yang menerima perlakuan lain untuk diketahui perbedaannya (Isnawan et al., 2020).

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah jenis metode ekstraksi (dekok dan infus) dan faktor kedua adalah perlakuan yaitu rasio kombinasi ekstrak yaitu kombinasi rasio 2.2.1, 2.1.2 dan 1.2.2. Kombinasi perlakuan berdasarkan dua faktor ini adalah sebanyak enam.

Menurut Hudori, (2018) penentuan banyaknya ulangan menggunakan rumus seperti berikut sebagai berikut: $(t - 1)(r - 1) \geq 15$

Keterangan : t = treatment/perlakuan

: r = replikasi/ulangan

$$: (6 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$: (5)(r - 1) \geq 15$$

$$: 5r - 5 \geq 15$$

$$: 5r \geq 15 + 5$$

$$: 5r \geq 20$$

$$: r \geq 4$$

Tabel 3. 1:Jumlah Kombinasi Perlakuan dan Ulangan

Metode Ekstraksi	Rasio Kombinasi	Ulangan			
		I	II	III	IV
Dekok (D)	2.2.1	D.2.2.1 I	D.2.2.1 II	D.2.2.1 III	D.2.2.1 IV
	2.1.2	D.2.1.2 I	D.2.1.2 II	D.2.1.2 III	D.2.1.2 IV
	1.2.2	D.1.2.2 I	I.1.2.2 II	I.1.2.2 III	D.1.2.2 IV
Infus (I)	2.2.1	I.2.2.1 I	I.2.2.1 II	I.2.2.1 III	I.2.2.1 IV
	2.1.2	I.2.1.2 I	I.2.1.2 II	I.2.1.2 III	I.2.1.2 IV
	1.2.2	I.1.2.2 I	I.1.2.2 II	I.1.2.2 III	I.1.2.2 IV

Berdasarkan rumus diatas, maka perlakuan dalam penelitian ini masing-masing dilakukan dalam empat kali ulangan sehingga secara keseluruhan menghasilkan 24 sampel.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang yang bertempat Jl. Tlogomas No. 246 Malang. Penelitian ini dilaksanakan kurang lebih 3 minggu.

3.4 Populasi, Sampel dan Teknik Sampling

3.4.1 Populasi

Populasi diperlukan karena sebagai sumber data. Populasi dalam penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea americana Mill*), biji ketumbar (*Coriandrum sativum L.*), dan bawang putih (*Allium sativum*) yang didapat dari pasar

Landungsari, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang.

3.4.2 Sampel

Sampel penelitian ini didapatkan dari Pasar Landungsari Malang. Sampel dalam penelitian ini adalah kombinasi daun alpukat (*Persea americana Mill*), biji ketumbar (*Coriandrum sativum L.*) dan bawang putih (*Allium sativum*). Terdapat tiga jenis rasio kombinasi yang digunakan adalah 2.2.1, 2.1.2 dan 1.2.2.

3.4.3 Tekning Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *simple random sampling*. Jumlah sampel dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus $(t - 1)(r - 1) \geq 15$ (Hudori, 2018) sehingga mendapatkan jumlah ulangan sebanyak 4. Menurut Ghasemzadeh (2010) melakukan uji antioksidan dengan alat spektrofotometer dengan 4 kali pemeriksaan atau pengulangan pada sampel.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi yang dilakukan pada kombinasi daun alpukat (*Persea americana Mill*), biji ketumbar (*Coriandrum sativum L.*), dan bawang putih (*Allium sativum*) dengan pelarut etanol yaitu dekok dan infus.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan pada kombinasi daun alpukat (*Persea americana Mill*), biji ketumbar (*Coriandrum sativum L.*), dan bawang putih (*Allium sativum*).

3.5.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea Americana Mill*), biji ketumbar (*Coriandrum Sativum L.*), dan bawang putih (*Allium Sativum*) yang didapatkan dari pasar berlokasi di landungsari, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang.

3.6 Definisi Operasional

- a. Etanol disebut juga etil alkohol dengan rumus kimia $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ dengan titik didihnya $78,4^\circ \text{C}$. Etanol memiliki sifat tidak berwarna, dapat bercampur dengan air. Dalam dunia medis, etanol digunakan sebagai bahan untuk sterilisasi permukaan (mejakursi), sebagai pengawet atau pelarut dalam obat, dan digunakan secara luas sebagai pelarut di industri dan penelitian (BPOM, 2014).
- b. Fenol adalah senyawa fenolik merupakan kelompok senyawa terbesar yang berperan sebagai anti oksidan pada tumbuhan. Senyawa fenolik memiliki satu (fenol) atau lebih (polifenol) cincin fenol, yaitu gugus hidroksi yang terikat cincin aromatik sehingga mudah teroksidasi dengan menyubangkan atom hidrogen pada radikal bebas (Zuraida et al., 2017).
- c. Antioksidan adalah substansi yang diperlukan untuk menetralsir radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Radikal bebas adalah atom yang tidak stabil karena kehilangan pasangan elektronnya (Riza Marjoni & Devi Novita, 2015).

- d. Daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang termasuk dalam famili tumbuhan *Lauraceae* yang banyak dimanfaatkan sebagai tanaman obat yang sangat penting sebagai obat tradisional untuk pengobatan seperti sariawan, kencing batu, darah tinggi, kulit muka kering sakit gigi, bengkak karena peradangan, dan kencing manis (Anggorowati et al., 2016b).
- e. Biji ketumbar (*Coriandrum sativum* L.) merupakan Salah satu tanaman yang memiliki potensi antioksidan adalah biji ketumbar (*Coriandrum sativum* L.) yang mengandung saponin, flavonoid, dan vitamin C yang dapat mencegah penyakit yang ditimbulkan oleh radikal bebas (Hijriah et al., 2022b).
- f. Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan tanaman dari keluarga Alliaceae yang memiliki antioksidan alami. Zat kimia yang terdapat pada bawang putih yang memiliki aktivitas antioksidan adalah *allicin* dan *S-allyl cysteine*, serta senyawa polar fenolik, dan steroid (Romsiah et al., 2020).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini, antara lain:

Tabel 3. 2 Alat dan Bahan

No	Alat	Bahan
1	Timbangan analitik	1
2	Gunting	1
3	Erlemeyer	3 Buah
4	Beaker glass	5 Buah
5	Spatula	5 Buah
6	Gelas ukur	3 Buah
7	Corong kaca	1 buah
8	Evaporator vakum	1 buah
9	Pipet tetes	3 buah

10	Pipet mikro	2 buah
11	Spektrofotometer UV-VIS	1 buah
12	Kain saring/kertas saring	Seperlunya
13	Labu ukur	15 buah
14	Inkubator	1 buah
15	Botol warna	3 buah
16	Oven	1 buah
17	Pipet ukur	2 buah
18	Alumunium foil	Seperlunya

Tabel 3. 3 Bahan

No	Bahan	Jumlah
1	Daun alpukat	40%
2	Biji ketumbar	30%
3	Bawang putih	30%
4	Etanol pa	30 ml
5	Aquades	1500 ml
6	DPPH	
7	Natrium karbonat 7%	
8	Asam galat	
9	Folin cicateau	

3.7.2 Metode Ekstraksi

A. Metode Dekok

1. Kumpulkan daun alpukat lalu cuci dengan bersih setelah itu dipotong kecil-kecil.
2. Kemudian dikeringkan dengan cara menutupkan kain hitam untuk mencegah pengaruh langsung dari cahaya matahari.
3. Daun alpukat yang sudah dikeringkan kemudian ditimbang sebanyak 10 g

dan ditambah aquades sebanyak 100 mL lalu dimasak selama 30 menit apabila suhu sudah mencapai 100°C.

4. Saring bahan dengan kertas saring kedalam gelas beker dan ditambah air panas secukupnya dalam ampas lalu disaring kembali sampai diperoleh volume infusa sebanyak 100 mL.
5. Memasukkan sampel infusa kedalam botol kaca dan dilabelkan sesuai jenisnya.
6. Kemudian ulangi langkah 1 hingga 5 bagi bahan biji ketumbar dan bawang putih.

B. Metode Infus

- 1) Kumpulkan daun alpukat lalu cuci dengan bersih setelah itu dipotong kecil-kecil.
- 2) Kemudian dikeringkan dengan cara menutupkan kain hitam untuk mencegah pengaruh langsung dari cahaya matahari.
- 3) Daun alpukat yang sudah dikeringkan kemudian ditimbang sebanyak 10 g dan ditambah aquades sebanyak 100 mL lalu dimasak selama 15 menit apabila suhu sudah mencapai 90°C.
- 4) Saring bahan dengan kertas saring kedalam gelas beker dan ditambah air panas secukupnya dalam ampas lalu disaring kembali sampai diperoleh volume infusa sebanyak 100 mL.
- 5) Memasukkan sampel infusa kedalam botol kaca dan dilabelkan sesuai jenisnya.
- 6) Kemudian ulangi langkah 1 hingga 5 bagi bahan biji ketumbar dan bawang putih.

3.7.3 Pembuatan Larutan Ekstrak Tunggal Daun Alpukat, Biji Ketumbar dan Bawang Putih

- a. Setiap sampel dari masing-masing metode ekstraksi yang didapatkan tadi, dipipet sebanyak 2,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan diisi dengan etanol sampai garis tanda batas (konsentrasi 100 ppm) (Rikantara et al., 2022).

3.7.4 Pembuatan Larutan Kombinasi Ekstrak Daun Alpukat, Biji Ketumbar dan Bawang Putih

- a. Kombinasi ekstrak dibuat berdasarkan rasio 2.2.1, 2.1.2 dan 1.1.2.
- b. Untuk rasio pertama yaitu 2.2.1, larutan ekstrak daun alpukat diambil sebanyak 1 mL (40 ppm), larutan ekstrak biji ketumbar sebanyak 1 mL (40 ppm) dan larutan ekstrak bawang putih sebanyak 0,5 mL (20 ppm).
- c. Rasio kedua yaitu 2.1.2, larutan ekstrak daun alpukat diambil sebanyak 1 mL (40 ppm), larutan ekstrak biji ketumbar sebanyak 0,5 mL (20 ppm) dan larutan ekstrak bawang putih sebanyak 1 mL (40 ppm).
- d. Rasio ketiga yaitu 1.2.2, larutan ekstrak daun alpukat diambil sebanyak 0,5 mL (20 ppm), larutan ekstrak biji ketumbar sebanyak 1 mL (40 ppm) dan larutan ekstrak bawang putih sebanyak 1 mL (40 ppm) (Rikantara et al., 2022).

3.7.5 Pelaksanaan Penelitian Uji Total Fenol

- a. Asam galat ditimbang sebanyak 50 mg kemudian tambahkan 1 mL etanol lalu tambahkan aquades sampai volume akhir 50 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL.

- b. Dari larutan induk, dipipet 1 mL lalu diencerkan dengan aquades sampai volume akhir 10 mL. Tambahkan reagen *Folin-Ciocalteau* sebanyak 1 mL diaduk sampai homogen dan tunggu selama 5 menit.
- c. Menambahkan larutan 10 mL Na₂CO₃ 7% lalu aduk hingga homogen.
- d. Menginkubasi selama 90 menit pada suhu kamar.
- e. Mengukur serapan panjang gelombang serapan maksimum 765 nm, kemudian membuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (µg/mL) dengan serapan.
- f. Ulangi langkah a hingga e untuk masing-masing kombinasi perlakuan yang ada.

3.7.6 Peaksanaan penelitian Uji Aktivitas Antioksidan

A. Pembuatan Larutan DPPH

1. Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan kedalam etanol sebanyak 100 mL.
2. Membuat stok larutan DPPH pada masing-masing konsentrasi dengan menambahkan etanol hingga tanda batas (40 mL).
3. Larutan DPPH disimpan pada wadah yang terlindung dari cahaya matahari (Sinala & Dewi, 2019).

B. Pembuatan dan Pengukuran Kurva Baku (Blanko)

1. Larutan DPPH 40 ppm dipipet sebanyak 2 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan etanol 96% kemudian dikocok hingga homogen lalu diinkubasi kisaran ± 30 menit.
2. mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm – 800 nm (Sinala & Dewi, 2019).

C. Uji Aktivitas Antioksidan

1. Masing-masing sampel rasio kombinasi ekstrak diambil sebanyak 2 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan DPPH sebanyak 2 mL.
2. Setelah itu larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama ± 30 menit dalam ruangan gelap (Rikantara et al., 2022).
3. Kemudian dilakukan uji absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 517 nm.
4. Menghitung nilai konsentrasi efektif atau IC_{50} menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ antioksidan} = \frac{A_c - A}{A_c} \times 100\%$$

Keterangan :

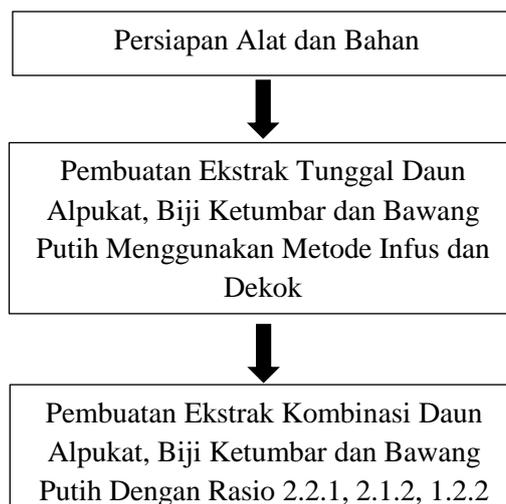
A_c = Nilai absorbansi control

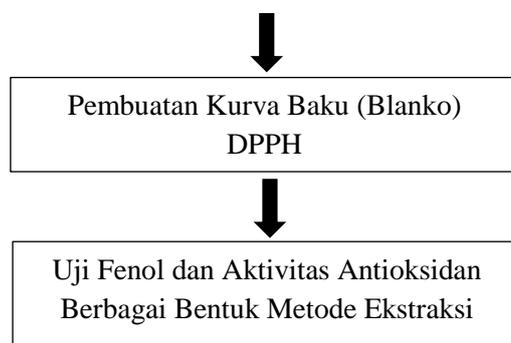
A = Nilai absorbansi sampel

Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (100-150), dan lemah 151-200). Semakin kecil nilai IC_{50} semakin tinggi aktivitas antioksidan (Irwinsyah et al., 2019).

3.7.7 Alur Penelitian

Alur pelaksanaan penelitian disajikan sebagai berikut:





3.8 Teknik Pengumpulan Data

Metode yang digunakan untuk pengambilan data dalam penelitian ini adalah observasi terstruktur. Teknik pengumpulan data secara langsung yang dirancang secara sistematis dengan melibatkan kegiatan melihat dan mencatat. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan di laboratorium terhadap objek perlakuan. Peneliti mengumpulkan data dari uji fenol dan aktivitas antioksidan kombinasi daun alpukat (*Persea Americana Mill*), biji ketumbar (*Coriandrum Sativum L.*), dan bawang putih (*Allium Sativum*) dengan metode dekok dan infus. Data dalam penelitian dikumpulkan dalam instrumen, untuk mengukur nilai variabel yang diteliti.

3.9 Teknik Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan kuantitatif. Digunakannya analisis kuantitatif untuk menghitung banyaknya senyawa fenol dan antioksidan pada ekstrak kombinasi daun alpukat (*Persea americana Mill*), biji ketumbar (*Coriandrum sativum L.*), dan bawang putih (*Allium sativum*) dengan menggunakan metode ekstraksi dekok dan infus. Analisis data kuantitatif menggunakan perhitungan statistika. Penelitian ini untuk menghitung statistika menggunakan SPSS. Uji yang digunakan yaitu *One Way Anova* untuk

membandingkan hasil dari kedua metode (dekok dan infus) dengan berbagai formulasi 2:2:1, 2:1:2 dan 1:2:2 yang diteliti. Analisis anova mempunyai data yang didistribusikan normal. Kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan's yang merupakan uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan antar metode dan melihat perlakuan mana yang paling baik.

