

**BAB III**  
**METODE PENELITIAN**

**A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian laboratorium eksperimental, untuk menentukan aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill.) berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1 menggunakan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*). Desain penelitian pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3.1.

Kombinasi	% Hambatan
K1 = - 2 ppm	IC <sub>50</sub>
- 4 ppm	
- 6 ppm	
- 8 ppm	
- 10 ppm	
K2 = - 2 ppm	
- 4 ppm	
- 6 ppm	
- 8 ppm	
- 10 ppm	
K3 = - 2 ppm	
- 4 ppm	
- 6 ppm	
- 8 ppm	
- 10 ppm	

Keterangan :

K1 = Daun Kelor : Daun Alpukat (1:1)

K2 = Daun Kelor : Daun Alpukat (1:2)

K3 = Daun Kelor : Daun Alpukat (2:1)

**Tabel 3.1 Desain Penelitian**

## **B. Lokasi Penelitian**

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).
2. Pembuatan ekstrak, dan uji fitokimia ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Analisa Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo.

## **C. Subjek Penelitian**

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill.) yang didapatkan dari daerah Kecamatan Sempor, Kabupaten Kebumen, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) sebanyak 4 kg dan daun alpukat (*Persea americana* Mill.) sebanyak 3 kg. Kriteria daun yang diambil merupakan daun segar yang muda dan tidak terlalu tua.

#### D. Variabel Penelitian

##### 1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan perbandingan 1:1, 1:2, 2:1.

##### 2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai IC<sub>50</sub>.

#### E. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3.2.

No	Variabel	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Skala ukur	Hasil ukur
1.	Ekstrak daun kelor	Ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10ppm	-	-	-	-
2.	Ekstrak daun alpukat	Ekstrak daun alpukat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10ppm	-	-	-	-
3.	Kombinasi ekstrak daun kelor dan daun alpukat	Kombinasi ekstrak daun kelor dan daun alpukat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10ppm	-	-	-	-
4.	IC <sub>50</sub>	Nilai penghambatan 50% sampel	DPPH	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	% inhibisi

**Tabel 3.2 Definisi Operasional**

## **F. Alat dan Bahan**

### 1. Alat

Timbangan digital, rotary evaporator (RE100-Pro), waterbath (memmert), oven (memmert), cawan (pyrex), tanur, krus kadar abu, pipet tetes, pipet ukur, ball pipet, beaker glass, batang pengaduk, blender (Maspion), ayakan no 40 mesh, corong pisah (pyrex), spatula, spektrofotometer UV-Vis (1900i), aluminium foil, toples kaca, gelas ukur, tabung reaksi (pyrex), rak tabung reaksi, kertas saring, gelas ukur, dan labu ukur.

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kelor dan daun alpukat, etanol 96%, DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*), asam asetat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kalium dikromat, etanol p.a, Mg, HCl pekat, pereaksi *mayer*, FeCl<sub>3</sub> 1%, aquadest, HCl 2N, dan kuersetin.

## **G. Prosedur Penelitian**

### 1. Determinasi tanaman

Tanaman yang akan diuji harus dilakukan determinasi terlebih dahulu. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP). Hasil dari determinasi tanaman ini digunakan untuk mengetahui dan menjamin kebenaran jenis atau spesies tanaman.

## 2. Pembuatan simplisia

Daun kelor dan alpukat yang sudah terkumpul dilakukan sortasi basah terlebih dahulu, kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya sampel dipotong dengan ukuran sedang untuk mempermudah proses pengeringan, lalu ditimbang dan dikeringkan dibawah sinar matahari tidak langsung dengan ditutup kain hitam. Setelah kering, simplisia akan melalui proses sortasi kering, kemudian sampel dapat dihaluskan menggunakan blender sampai halus untuk memperbesar luas permukaan saat proses ekstraksi (Rakhmawatie & Marfu'ati, 2023). Selanjutnya simplisia yang telah dihaluskan diayak menggunakan ayakan no 40 mesh (Yuliani *et al.*, 2021). Ayakan no 40 mesh digunakan untuk mendapatkan serbuk dengan ukuran seragam dan homogen (Maulidah *et al.*, 2022).

## 3. Uji kadar air simplisia

Pengujian kadar air pada simplisia dapat dilakukan menggunakan metode pengeringan atau gravimetri. Serbuk simplisia daun kelor dan daun alpukat ditimbang masing-masing sebanyak 2 gram pada cawan yang telah diketahui bobotnya. Kemudian masukkan cawan berisi sampel ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Setelah 3 jam dinginkan cawan berisi sampel, lalu timbang cawan tersebut (Wandira *et al.*, 2023).

Perhitungan kadar air dilakukan dengan rumus berikut :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{b-(c-a)}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat cawan

b = berat sampel

c = berat cawan + sampel setelah di oven

#### 4. Uji kadar abu total simplisia

Penetapan kadar abu total pada simplisia dilakukan dengan metode gravimetri atau pengeringan yaitu dengan menimbang sebanyak 2 gram masing-masing simplisia daun kelor dan daun alpukat ke dalam cawan krusible yang telah diketahui beratnya. Kemudian masukkan ke dalam tanur dengan suhu 600° C selama 3 jam hingga menjadi abu, lalu didinginkan dan ditimbang (Nurhidayah *et al.*, 2019).

Rumus untuk menghitung kadar abu total simplisia adalah sebagai berikut :

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{B-A}{C} \times 100\%$$

Keterangan :

A = berat krus (g)

B = berat krus + sampel setelah diabukan (g)

C = berat sampel (g)

#### 5. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak daun kelor dan daun alpukat dilakukan dengan metode ekstraksi atau perendaman. Pada proses ekstraksi pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Serbuk simplisia daun kelor dan daun alpukat masing-masing ditimbang sebanyak 500 gram dan diekstraksi dengan 2,5 L pelarut etanol 96% selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap 12 jam selama 5 menit (Chairunnisa *et al.*, 2019). Setelah itu

dilakukan remaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1 L selama 2 hari. Setelah proses ekstraksi selesai, dilakukan penyaringan dengan kain bersih untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 60<sup>0</sup> C untuk memisahkan ekstrak dengan etanol 96%. Kemudian ekstrak dipekatkan menggunakan waterbath dengan suhu 60<sup>0</sup> C sampai diperoleh ekstrak kental (Tuldjanah *et al.*, 2022). Masing-masing ekstrak yang didapat dihitung rendemennya menggunakan rumus berikut :

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{b}{a} \times 100 \%$$

Keterangan :

a = berat simplisia (g)

b = berat ekstrak yang didapat (g)

#### 6. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui apakah dalam ekstrak masih ada atau tidaknya kandungan etanol. Uji bebas etanol dilakukan dengan memasukkan sebanyak 0,5 gram masing-masing ekstrak kental ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 2 mL asam asetat dan 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lalu panaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol jika tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Priamsari & Rokhana, 2020). Untuk uji bebas etanol dengan perubahan warna masing-masing ekstrak diambil sebanyak 1 gram lalu ditambahkan 1 mL kalium dikromat dan 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Hasil positif bebas dari etanol bila tidak terjadi perubahan warna jingga menjadi hijau kebiruan (Klau *et al.*, 2021).

## 7. Uji kadar air ekstrak

Pengujian kadar air pada ekstrak dilakukan dengan menimbang masing-masing ekstrak daun kelor dan daun alpukat sebanyak 2 gram, masukkan ke dalam cawan porselin yang sebelumnya telah ditimbang. Masukkan cawan porselin berisi ekstrak ke dalam oven selama 3 jam dengan suhu 105<sup>0</sup> C, kemudian dinginkan dan ditimbang. Syarat kadar air pada ekstrak yang baik adalah  $\leq 10\%$  (Himawan *et al.*, 2018). Kadar air ekstrak dihitung menggunakan rumus berikut :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{b-(c-a)}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat cawan

b = berat sampel

c = berat cawan + sampel setelah di oven

## 8. Skrinning fitokimia pada ekstrak

### a. Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan mengambil masing-masing ekstrak kental sebanyak 0,5 gram, kemudian larutkan dalam etanol p.a, lalu tambahkan 0,1 gram Mg dan 5 tetes HCl pekat. Hasil yang positif flavonoid akan membentuk warna jingga (Narsa *et al.*, 2022).

### b. Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 0,5 gram, lalu tambahkan dengan 2 tetes HCl 2 N, pekatkan larutan kemudian tambahkan dengan pereaksi *Mayer*, hasil

positif alkaloid bila membentuk endapan jingga atau coklat (Azzahra & Budiati, 2022).

c. Uji fenol

Pengujian fenol dilakukan dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 0,5 gram, kemudian tambahkan 2 ml etanol 96%. Tambahkan  $\text{FeCl}_3$  1% sebanyak 3 tetes. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi biru, hijau, atau merah (Qodri, 2023).

d. Uji tannin

Pengujian tannin dilakukan dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 0,5 gram, lalu rebus dengan 20 ml aquades di dalam tabung reaksi, kemudian saring dan tambahkan beberapa tetes 0,1%  $\text{FeCl}_3$  hingga terjadi perubahan warna. Ekstrak yang positif ditandai dengan munculnya warna hijau kecoklatan atau biru hitam (Klau *et al.*, 2021).

e. Uji saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 0,5 gram, lalu tambahkan 5 mL aquades dan kocok kuat-kuat. Uji positif mengandung saponin ditandai dengan terbentuknya busa atau buih (Klau *et al.*, 2021).

## 9. Pengujian aktivitas antioksidan

### a. Pembuatan larutan DPPH 40 ppm

Larutan stok DPPH 40 ppm dibuat dengan menimbang sebanyak 4 mg serbuk DPPH, kemudian larutkan dengan etanol p.a 100 mL di dalam labu ukur (Langi *et al.*, 2020)

### b. Penentuan panjang gelombang maksimum

Pada penentuan panjang gelombang maksimum digunakan larutan DPPH 40 ppm yang diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 400 – 800 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Amelia & Nasution, 2022).

### c. Penentuan operating time DPPH

Operating time ditentukan dengan mengukur nilai absorbansi larutan DPPH 40 ppm menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan dengan interval waktu 1-30 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Amelia & Nasution, 2022).

### d. Pembuatan dan pengukuran absorbansi larutan blanko

Larutan blanko dibuat dengan memipet larutan DPPH 40 ppm sebanyak 3 mL, masukkan ke dalam labu ukur 5 ml dan tambahkan 2 mL etanol p.a. Ukur serapan larutan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Jumawardi *et al.*, 2021).

- e. Pembuatan dan pengukuran aktivitas antioksidan baku pembanding kuersetin

Pembuatan larutan baku induk kuersetin dilakukan dengan menimbang 10 mg kuersetin, lalu larutkan dengan etanol p.a 10 mL sehingga didapatkan larutan baku kuersetin 1000 ppm. Larutan induk dibuat kadar seri 100 ppm dengan memipet 1 mL lalu masukkan ke dalam labu ukur 10 mL, tambahkan etanol p.a sampai tanda batas (Susiloningrum & Sari, 2021).

Larutan 100 ppm dibuat seri konsentrasi 2 ppm; 4 ppm; 6 ppm; 8 ppm; 10 ppm dengan memipet 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan tambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Masing-masing seri konsentrasi dipipet sebanyak 2 mL dan ditambahkan 3 mL DPPH. Kemudian diamkan larutan selama *operating time* dengan ditutup alumunium foil dan baca absorbansi dengan panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Jumawardi *et al.*, 2021).

- f. Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak tunggal daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak tunggal daun kelor dan daun alpukat dilakukan dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 10 mg, lalu larutkan menggunakan etanol pada labu ukur 10 mL, cukupkan volumenya menggunakan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan induk dibuat kadar seri 100 ppm dengan memipet

1 mL lalu masukkan ke dalam labu ukur 10 mL, tambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Kemudian buat variasi konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm pada masing-masing ekstrak tunggal. Setelah itu pipet 2 mL larutan pada setiap konsentrasi, tambahkan larutan DPPH sebanyak 3 mL. Diamkan larutan di tempat yang gelap selama *operating time*. Serapan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Yasir *et al.*, 2023).

- g. Pengujian aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

Pengujian aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak daun kelor dan daun alpukat dengan perbandingan 1;1, 1;2, 2;1. Larutan induk 1000 ppm dibuat kadar seri 100 ppm dengan memipet 1 mL lalu masukkan ke dalam labu ukur 10 mL, tambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Kemudian buat variasi konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm pada masing-masing ekstrak kombinasi. Setelah itu pipet 2 mL larutan pada setiap konsentrasi, tambahkan larutan DPPH sebanyak 3 mL. Diamkan larutan di tempat yang gelap selama *operating time*. Serapan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Susiloningrum & Sari, 2021).

## H. Analisis Data

Aktivitas antioksidan dari suatu sampel dinyatakan dengan  $IC_{50}$  atau *inhibition concentration* 50%.  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka antioksidan semakin kuat dalam menangkal radikal bebas atau bisa dikatakan memiliki antioksidan yang kuat (Maryam, 2015). Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali yang kemudian data hasilnya diolah menggunakan excel.

Rumus untuk menghitung presentase aktivitas antioksidan :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Absorbansi blanko

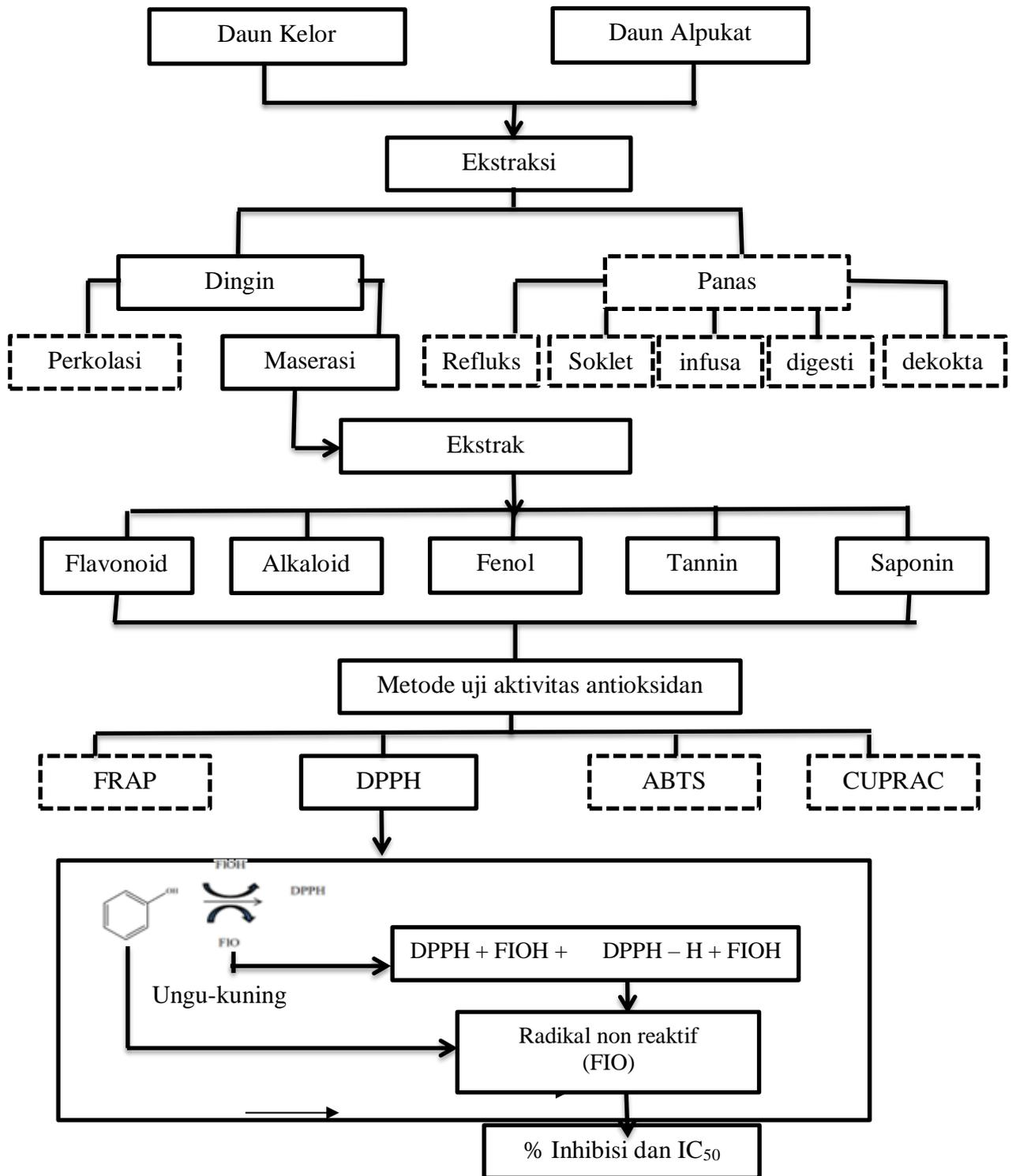
B = Absorbansi sampel

Setelah mendapatkan persen inhibisi dari setiap konsentrasi dilanjutkan dengan perhitungan persamaan regresi linear untuk mendapatkan nilai  $IC_{50}$  dimana x adalah konsentrasi (ppm) dan y adalah persentasi aktivitas (%). Nilai  $IC_{50}$  didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50. Kemudian data tersebut dianalisis secara statistik parametrik untuk melihat perbedaan aktivitas antioksidan ekstrak tunggal daun kelor dan daun alpukat maupun kombinasi kedua ekstrak tersebut, yang dianalisis menggunakan SPSS versi 26.

Uji pertama yang dilakukan adalah uji normalitas data untuk melihat apakah data yang didapat terdistribusi normal, pada penelitian ini digunakan

uji Shapiro-Wilk karena data yang digunakan  $< 50$  (Agustin & Permatasari, 2020). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah data yang digunakan pada penelitian ini telah homogen. Data yang telah terdistribusi normal dan homogen dilakukan uji *One Way ANOVA*, tetapi untuk data yang tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji non parametric *Kruskal Wallis* dan uji *Mann Withney*. Jika nilai signifikan  $> 0,05$  maka  $H_0$  diterima, artinya tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok, tetapi jika nilai  $\leq 0,05$  maka  $H_0$  ditolak, artinya terdapat perbedaan signifikan antara kelompok (Fatimah, 2023).

**I. Alur Penelitian**



Keterangan :   
 ————— = diteliti   
 - - - - - = tidak diteliti

**Gambar 3.1 Alur Penelitian**