

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium pada daun alpukat (*Persea americana* Mill) dengan dilakukan pengujian suhu refluks (40°C, 60°C dan, 80°C) terhadap kadar flavonoid total.

#### **B. Lokasi Penelitian**

1. Determinasi tanaman alpukat (*Persea americana* Mill) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan simplisia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Dasar Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
4. Uji kadar flavonoid total dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

#### **C. Subjek Penelitian**

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang berasal dari desa Tegalorejo Kecamatan Wirosari, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah.

## 2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun alpukat (*Persea americana* Mill) sebanyak 4 kg dari sampel daun yang masih segar yang berasal dari desa Tegalrejo Kecamatan Wirosari, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah.

### **D. Definisi Operasional**

#### 1. Variabel Independen

Variabel independen atau variabel bebas adalah faktor yang mempengaruhi hasil atau penyebab terutama perbedaan, variabel bebas pada penelitian ini adalah suhu refluks dengan menggunakan variasi suhu refluks 40°C, 60°C dan, 80°C.

#### 2. Variabel Dependen

Variabel dependen pada penelitian ini adalah kadar flavonoid total pada daun alpukat (*Persea americana* Mill).

#### 3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dari penelitian ini yaitu cara pembuatan simplisia mulai dari pengumpulan sampel, pencucian, hingga pengeringan, pelarut yang digunakan, daun alpukat yang segar serta berasal dari desa Tegalrejo Kecamatan Wirosari, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah

### **E. Pengumpulan Data**

#### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam proses penelitian ini adalah Timbangan analitik (Matrix), magnetic stirrer (Malven), seperangkat alat gelas

(Pyrex), blender, rotary evaporator, ayakan mesh 40, oven, pipet volume 1 mL dan 10 mL, pipet tetes, 1 set alat refluks, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu ukur 10 ml, labu ukur 50 ml, statif, klem, neraca digital, thermometer, erlenmeyer, kain flanel, mikropipet, dan spektrofotometri UV-Vis.

## 2. Bahan

Daun alpukat (*Persea americana* Mill) berasal dari desa Tegalrejo Kecamatan Wirosari, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan etanol (p.a), etanol 96%, kuersetin, asam asetat, kalium dikromat, n-butanol, silika gal G60 F<sub>254</sub>, aluminium klorida 10% dan aquadest.

## F. Pengolahan Data

### 1. Pembuatan simplisia

Langkah pertama yang dilakukan yaitu pembuatan simplisia daun alpukat (*Persea americana* Mill). Pengambilan daun alpukat dipilih dari warna daun hijau muda yang telah membuka sempurna dan terletak dibagian cabang atau batang yang menerima sinar matahari sempurna dengan kondisi daun yang segar, tidak terlalu muda, dan tidak terlalu tua, kemudian daun alpukat dipisahkan dari batang yang masih menempel setelah itu dilakukan sortasi basah terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran pada simplisia (Alfian, 2018), setelah sortasi basah dilanjutkan dengan proses perajangan dengan memotong sesuai ketebalan yang diinginkan. Setelah dilakukan perajangan

pada daun alpukat dikeringkan di bawah sinar matahari dengan penutup kain hitam di atasnya, setelah kering dengan sempurna daun alpukat dilakukan sortasi kering dengan memisahkan antara simplisia dengan zat pengotor yang masih tersisa pada daun selanjutnya daun alpukat dihaluskan dengan blender agar didapatkan serbuk simplisia dilanjutkan dengan proses pengayakan dengan no 40 mesh, karena semakin kecil ukuran serbuk maka semakin luas permukaan penampang sehingga semakin banyak senyawa bioaktif yang tertarik oleh pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi.

## 2. Uji Kadar Air Simplisia dan Ekstrak

Uji kadar air menggunakan oven dengan cara mengambil serbuk simplisia maupun ekstrak sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam, kemudian ditunggu hingga dingin dan ditimbang lagi untuk menentukan kadar air dalam simplisia dan ekstrak tersebut (Syafrida *et al.*, 2018). Cara penghitungan kadar air dapat menggunakan rumus:

$$\% \text{ kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100\%$$

Keterangan:

a : berat cawan kosong

b : berat cawan kosong + sampel sebelum di oven

c : berat cawan kosong + sampel setelah di oven

Syarat nilai kadar air yang ditetapkan untuk menjaga mutu simplisia adalah  $\leq 10\%$  (Wijaya & Noviana, 2022).

### 3. Uji Kadar Abu Simplisia

Uji kadar abu daun alpukat dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk simplisia maupun ekstrak dimasukkan ke dalam krus lalu dimasukkan ke dalam oven 600°C selama 3 jam. Krus didinginkan pada suhu ruang dan ditimbang. Perhitungan kadar abu dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

W : bobot serbuk simplisia (g)

W1: bobot serbuk simplisia (g)

W2: bobot krus kosong (g)

Syarat nilai kadar abu pada simplisia daun daun yaitu dengan nilai  $\leq 16\%$  (Abdurahman, 2022).

### 4. Ekstraksi

Serbuk daun alpukat diekstraksi menggunakan metode refluks dengan membuat 3 larutan yang sama menggunakan pelarut etanol 96% dan serbuk simplisia sebanyak 80 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat, ditambahkan pelarut etanol sebanyak 400 mL atau dengan perbandingan simplisia dan pelarut 1:5. Kemudian sampel dipanaskan menggunakan *water bath* dan suhu diatur 40°C, 60°C, dan 80°C. Pelarut akan menguap dan terkondensasi pada kondensor dipasang dengan selang aliran air dari bawah menuju keatas kondensor sebagai proses pendinginan dan pelarut kembali turun mencair menuju labu alas bulat, proses ini terus berjalan hingga 3 jam saat penyari kelihatan pekat (Susanty & Bachmid, 2016).

Selanjutnya setelah dingin dilakukan penyaringan larutan menggunakan kain flanel. Pelarut diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 50 rpm. Penggunaan suhu 50°C pada *rotary evaporator* dan *water bath* sebagai suhu stabil untuk flavonoid sehingga senyawa flavonoid tidak hilang atau rusak (Suminar, 2018). Proses penguapan dihentikan saat ekstrak mulai kental dan terlihat batas garis tebal pada labu. Ekstrak kemudian diuapkan dengan *water bath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang sudah kental selanjutnya dihitung persentase rendemennya dengan menggunakan menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat awal simplisia}} \times 100\%$$

Persentase rendemen diperoleh dari hasil perhitungan berat ekstrak dibagi dengan berat awal sampel (berat simplisia) dalam satuan persen (Jumawardi, 2021).

#### 5. Uji Bebas Etanol

Ekstrak daun alpukat diambil sebanyak 1 gram lalu ditambahkan 1 mL kalium dikromat dan 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Hasil positif etanol ditandai dengan perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2021)

#### 6. Uji Standarisasi Spesifik Ekstrak

##### a. Uji Organoleptis

Pada pengujian organoleptis dilakukan pengamatan secara langsung seperti bentuk, warna, dan bau (Yuliana, 2022).

b. Uji Warna Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 mL etanol dan dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Larutan ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Larutan kemudian ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg. Adanya flavonoid ditunjukkan oleh timbulnya warna merah coklat (Kala`Rante *et al.*, 2020).

c. Uji Kualitatif Flavonoid menggunakan KLT

Ekstrak etanol daun alpukat dengan metode refluks masing-masing ditimbang sebanyak 0,01 gram dilarutkan dalam etanol 96% 1 ml, kemudian ditotolkan ekstrak pada lempeng KLT. Kemudian dimasukkan lempeng tersebut dalam wadah bejana yang berisi fase gerak n butanol : asam asetat akuades (4:1:5) yang telah dijenuhkan, selanjutnya ditunggu hingga fase gerak merambat sampai tanda batas. Kemudian dikeluarkan lempeng ditunggu sampai kering dulu, lalu dilakukan pengupuan menggunakan amonia. Hasil elusi diamati dengan lampu UV 254 nm dan 365 nm, sebagai zat pembanding digunakan kuersetin dengan menimbang sebanyak 0,1 gram sampel kemudian dilarutkan dengan etanol sebanyak 1 mL (Islamiyati & Saputri, 2018).

7. Pengujian Flavonoid

a. Pembuatan pereaksi  $AlCl_3$  10%

Diambil dan ditimbang 10 gram  $AlCl_3$  dan dilarutkan dengan aquadest hingga tanda batas labu ukur 100 mL.

b. Pembuatan larutan asam asetat 5%

Diambil 5 mL asam asetat dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 100 mL (Kumalasari et al., 2018).

c. Pembuatan larutan blanko

Diambil etanol p.a sebanyak 2 mL, 0,1  $\text{AlCl}_3$  10% 0,1 mL dan asam asetat 5% 0,1 mL, kemudian ditambahkan aquades pada labu ukur 10 mL sampai tanda batas (Supriningrum *et al.*, 2017).

d. Pembuatan larutan baku kuersetin

Diambil dan timbang serbuk kuersetin sebanyak 25 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a sebanyak 25 mL di dapatkan konsentrasi 1000 ppm.

e. Penentuan kadar seri kuersetin

Larutan baku kuersetin 1000 ppm diencerkan menjadi seri kadar 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm. Kemudian di pipet 1 mL larutan standar dari masing konsentrasi kemudian ditambahkan 1 mL alumunium klorida 10%, 8 mL larutan asam asetat. Selanjutnya diinkubasi selama waktu yang ditentukan dan di ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Ramadhani *et al.*, 2020).

f. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Diambil larutan kuersetin 1000 ppm sebanyak 1 mL, diencerkan dengan etanol p.a sebanyak 10 mL didapatkan 100 ppm. Kemudian diambil 1 mL larutan standar 1 mL ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%

kemudian ditambahkan 8 mL larutan asam asetat 5%. Pengukuran panjang gelombang kuersetin dilakukan dengan cara *running* larutan kuersetin dengan rentang panjang gelombang 400-500 nm (Winahyu *et al.*, 2018).

g. Penentuan *operating time* kuersetin

Diambil larutan kuersetin 100 ppm sebanyak 1 mL, ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL larutan asam asetat 5%. Kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai serapan stabil (Bakti *et al.*, 2017).

h. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan baku induk kuersetin 1000 ppm dibuat seri kadar sebesar 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm dipipet 0,2 mL; 0,3 mL; mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai volumenya 5 mL. Sebanyak 1 mL larutan seri kadar dari masing-masing konsentrasi direaksikan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5% ditunggu selama *operating time*. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Ipandi *et al.*, 2016).

8. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Ekstrak dibuat dengan larutan konsentrasi 1000 ppm dengan cara mengambil ekstrak sebanyak 100 mg dilarutkan dengan etanol p.a 100 mL, kemudian diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  dan 8 mL larutan asam asetat. Selanjutnya diinkubasi selama waktu yang

telah ditentukan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Ramadhani *et al.*, 2020).

## **G. Analisa Data**

### **1. Analisa data dari hasil pengukuran**

Sampel dianalisis secara kualitatif menggunakan metode KLT untuk membuktikan bahwa ekstrak yang diperoleh mengandung flavonoid kemudian dianalisis secara kuantitatif menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis untuk menentukan perbedaan kadar flavonoid total dari metode ekstraksi refluks.

### **2. Uji Statistika**

Hasil yang diperoleh dianalisis dengan One Way ANOVA dengan program SPSS versi 11 dimulai dengan uji normalitas, dilanjutkan dengan uji homogenitas, kemudian setelah data normal dan homogen, masuk ke tahap uji One Way Anova, dan post hoc tests untuk mengetahui apakah ada perbedaan signifikan terhadap suhu pemanasan 40°C, 60°C dan, 80°C pada kadar flavonoid total ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill).