

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% daun nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dengan menggunakan metode CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*).

3.2. Waktu dan Penelitian

Waktu penelitian dimulai dari february hingga juni 2024, tempat yang digunakan untuk penelitian yaitu di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Borneo Lestari.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak etanol 96% daun nanas
(*Ananas comosus* L. Merr)

3.3.2. Variabel terikat : Nilai aktivitas antioksidan daun nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dari nilai EC₅₀ menggunakan metode CUPRAC

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari, cawan penguap, batang pengaduk, bejana maserasi, corong kaca (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), gelas beaker (*Pyrex*[®]), kuvet (*Quartz Cuvette*[®]), mikropipet (*Dragon Lab*[®]), pipet tetes, *rotary evaporator* (*IKRF10*), sendok tanduk, spektrofotometer UV-Vis (*PG Instrument*[®]), *stopwatch*, tabung reaksi (*Iwaki*[®]), timbangan analitik (*Ohaus*[®]), vial gelap, vortex (*Bionex*[®]), *waterbath* (*Memmert*[®]).

3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari, daun nanas (*Ananas comosus* L. Merr), aquadest, *aluminium foil*, asam asetat anhidra ($C_4O_6H_3$) (*Merck*[®]), asam klorida pekat (HCl) (*Merck*[®]), asam sulfat pekat (H_2SO_4) (*Smart-Lab*[®]), *aquadest* (*Onemed*[®]), etanol p.a (*Merck*[®]), etanol 96% (*Onemed*[®]), gelatin, kertas label, kertas perkamen, kertas saring, kuersetin (*Merck*[®]), kloroform ($CHCl_3$) (*Merck*[®]), larutan besi (III) klorida ($FeCl_3$) (*Merck*[®]), magnesium (Mg) (*Merck*[®]), natrium klorida (NaCl), pereaksi *Dragendorff*, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Wagner*, dan *copper* (II) chloride dihydrate ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Tumbuhan

Tumbuhan nanas yang digunakan pada penelitian ini adalah tumbuhan yang diambil di daerah Kecamatan Tamban, Kabupaten Barito Kuala, Provinsi Kalimantan Selatan, pada bulan November 2023. Untuk bagian tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian daun (*Folium*).

3.5.2. Determinasi

Determinasi pada tumbuhan nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dilakukan di Laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat. Determinasi ini dilakukan untuk memvalidasi bahwa tumbuhan yang digunakan benar merupakan tumbuhan nanas (*Ananas comosus* L. Merr)

3.5.3. Pembuatan Simplisia

Daun nanas yang digunakan pada penelitian ini yaitu sebanyak 4 kg. Setelah didapatkan sampel daun maka kemudian dilakukan pengumpulan bahan, sortasi basah, pencucian dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, perajangan dengan membuang bagian duri pada daun dan memotong daun menjadi bagian-bagian yang lebih kecil, pengeringan dengan cara diangin-anginkan dan dikeringkan dibawah panas matahari langsung dan untuk simplisia yang

dikeringkan harus ditutupi dengan kain hitam selama proses pengeringan, kemudian dilakukan sortasi kering, selanjutnya simplisia yang sudah kering kemudian dilakukan penyerbukan dengan cara diblender, kemudian ditimbang dan disimpan pada wadah tertutup. Rendemen simplisia dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat simplisia (akhir)}}{\text{bobot bahan baku (awal)}} \times 100\%$$

3.5.4. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini yaitu menggunakan metode maserasi dengan perbandingan maksimal 1 : 7. Ekstraksi dilakukan dengan mencampurkan serbuk simplisia sebanyak 150 g dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1050 mL atau sampai simplisia terendam dengan pelarut 2-3 jari diatas serbuk simplisa (Ningsih, 2020). Proses ekstraksi dilakukan selama 1 x 24 jam dalam bejana yang tertutup rapat dan terlindungi dari sinar matahari, sambil dilakukan pengadukan setiap 8 jam sekali. Setelah 1 hari kemudian maserat disaring menggunakan kertas saring dengan memisahkan ampas dengan maserat untuk mendapatkan filtrat. Filtrat selanjutnya ditampung dalam beaker glass (Wahyudi & Minarsih, 2023).

Perlakuan selanjutnya yaitu dilakukan remaserasi yang diawali dengan serangkaian proses seperti pada maserasi, setelah dilakukan

penyaringan ampas kemudian direndam menggunakan pelarut baru dengan perbandingan yang sama dengan proses sebelumnya. Hasil filtrat dari masing-masing perlakuan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C lalu dikentalkan diatas *waterbath* pada suhu 50°C hingga didapatkan bobot tetap (Wahyudi & Minarsih, 2023). Rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan rumus berikut. (Sa'adah & Nurhasnawati, 2017).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental (gr)}}{\text{berat simplisia awal (gr)}} \times 100\%$$

3.5.5. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan prosedur sesuai literatur dengan sedikit modifikasi.

a. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan mengambil ekstrak sebanyak 1 g, kemudian ekstrak dilarutkan dengan aquadest. Ekstrak kemudian disaring dan dimasukkan kedalam gelas beker lalu dipanaskan selama ± 2 menit.

b. Alkaloid

Untuk pengujian alkaloid, diambil larutan uji kemudian tambahkan 1 mL HCL 2N. Filtrat kemudian diambil dan dimasukkan ke 3 tabung reaksi masing-masing 0,5 mL. Pada

masing-masing tabung ditambahkan 2 tetes pereaksi untuk pereaksi *dragendorff*, pereaksi *wagner*, dan pereaksi *mayer*. Hasil positif pereaksi *mayer* ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih hingga kekuningan, hasil positif pereaksi *dragendorff* ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah bata (Sulistyarini *et al.*, 2019), dan hasil positif pereaksi *wagner* ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat-hitam (Wahyuni & Marpaung, 2020).

c. Flavonoid

Untuk pengujian flavonoid, diambil larutan uji kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan serbuk Mg, 1 mL HCl pekat dan 1 mL amilalkohol kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol (Nugrahani *et al.*, 2016).

d. Fenol

Untuk pengujian fenol, diambil larutan uji kemudian ditambahkan dengan besi (III) klorida sebanyak 1-2 tetes. Hasil positif fenol ditandai dengan terjadi perubahan warna hijau, biru, atau kehitaman (Astuti, 2023).

e. Saponin

Untuk pengujian saponin, diambil larutan uji kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan kocok secara vertikal selama 10 detik, lalu diamkan selama 10 menit apabila terbentuk busa yang stabil dalam tabung maka menunjukkan adanya saponin. Kemudian teteskan 1 tetes HCL 2N (G. Ningsih et al., 2015). Hasil positif jika busa yang terbentuk tetap stabil selama ± 10 menit (Yanti & Vera, 2019).

f. Steroid/Terpenoid

Ekstrak dilarutkan dalam 2 mL kloroform, ditambahkan 10 tetes asam asetat glasial dan 3 tetes asam sulfat pekat (Liebermann-burchard), didiamkan beberapa menit. Munculnya warna merah/ungu mengindikasikan terpenoid, sedangkan warna biru/hijau mengindikasikan steroid (Rishliania, 2022).

3.5.6. Uji Aktivitas Antioksidan**a. Pembuatan Larutan CUPRAC****1. Pembuatan larutan CuCl_2**

Dibuat larutan CuCl_2 dengan menimbang $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,0425 g kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL lalu larutkan serbuk dengan aquadest sampai tanda batas. (Sayakti *et al.*, 2022).

2. Pembuatan Larutan Neocuproine (Nc)

Neocuproine (Nc) sebanyak 0,039 g dilarutkan dalam labu ukur 25 mL dengan etanol *p.a* dan diencerkan sampai tanda batas (Sayakti *et al.*, 2022).

3. Pembuatan Larutan *Buffer* Amonium asetat

Larutkan NH_4Ac pH 7 sebanyak 1,9273 g pada labu ukur 25 mL kemudian ditambahkan aquadest hingga tanda batas (Sayakti *et al.*, 2022).

b. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum

Pengukuran panjang gelombang mengambil 1 mL larutan 0.01 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mL 0,0075 M Nc, 1 mL 1 M bufer amonium asetat dan 0,1 mL aquades kemudian dimasukkan kedalam vial. Larutan kemudian dituang kedalam kuvet dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Sayakti *et al.*, 2022).

c. Penentuan Operating Time

Larutan baku kuersetin 3 ppm, dipipet sebanyak 0,1 mL larutan kuersetin kemudian ditambahkan dengan 1 mL larutan 0,01 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mL 0,0075 M Nc, 1 mL 1 M bufer amonium asetat diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 2 menit selama 60 menit. Hingga tercapai waktu hasil absorbansi yang stabil (Afifah *et al.*, 2023).

d. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin (Kontrol Positif)

Dibuat larutan induk kuersetin 1000 ppm dengan menimbang kuersetin sebanyak 10 mg kemudian dimasukkan ke labu ukur 10 mL dan ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas. Kemudian diencerkan menjadi 100 ppm dengan mengambil larutan stok sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etanol *p.a* sampai tanda batas (Sayakti *et al.*, 2022).

e. Pembuatan Larutan Kurva Baku

Dibuat larutan kurva baku 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dengan memipet larutan kuersetin 100 ppm sebanyak 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 mL ; dan 0,5 mL kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL secara terpisah dan ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas (Sayakti *et al.*, 2022).

f. Pengukuran Larutan Blanko CUPRAC

Larutan blanko dibuat dengan mengambil masing-masing sebanyak 1 mL larutan 0.01 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0075 M Nc, 1 M *buffer* amonium asetat, etanol *p.a* dan dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditambahkan 0,1 mL aquades. Inkubasi vial selama waktu stabil yang didapatkan dari penentuan operating time kemudian dibaca serapan maksimumnya dengan panjang gelombang yang telah diperoleh (Sayakti *et al.*, 2022).

g. Pengukuran Antioksidan Larutan Kuersetin

Pengukuran dilakukan dengan mengambil setiap seri larutan kuersetin dan dimasukkan ke dalam vial secara terpisah. Pada semua vial dimasukkan masing-masing 0.01 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mL 0,0075 M Nc, 1 mL 1 M bufer amonium asetat dan 0,1 mL aquades. Kemudian diinkubasi pada ruangan gelap selama waktu stabil yang didapatkan dari penentuan operating time. Larutan kemudian dituang kedalam kuvet dan diukur serapannya pada panjang gelombang yang sudah diperoleh menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Sayakti *et al.*, 2022). Selanjutnya dibuat kurva kalibrasi untuk regresi linear dengan menghubungkan nilai serapan sebagai koordinat (Y) dan konsentrasi larutan standar sebagai absis (X) (Hasanah & Novian, 2020).

h. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Daun Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dengan Larutan Sampel

Dibuat larutan uji dengan melarutkan ekstrak etanol 96% daun nanas 10 mg dengan etanol *p.a* dalam labu ukur 10 mL untuk memperoleh larutan stok dengan konsentresi 1000 ppm. Larutan induk kemudian dibuat ke konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm dengan memipet larutan induk masing-masing pada labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas. Masing-masing konsentrasi larutan kemudian diujikan dengan

memasukkan 1 mL ke dalam vial secara terpisah kemudian ditambahkan 1 mL larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 M, 1 mL Nc 0,0075 M, 1 mL buffer amonium asetat 1 M dan 0,1 mL aquades. Dilakukan inkubasi selama waktu stabil yang didapatkan dari penentuan operating time kemudian diukur absorbansi sampel pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Sayakti *et al.*, 2022).

3.6. Analisis Data

Analisis data untuk menginterpretasikan hasil uji efektivitas antioksidan dengan parameter menggunakan metode CUPRAC dinyatakan dengan *Effective Concentration* (EC_{50}) melalui uji aktivitas antioksidan yang diukur sebagai persen kapasitas untuk kemudian dimasukkan kedalam persamaan regresi linier.

- % kapasitas dihitung melalui persamaan berikut (Amilin, 2018):

$$\% \text{ Kapasitas} = (1 - Ts) \times 100\%$$

Keterangan :

A_s = Absorbansi sampel uji setelah penambahan larutan CUPRAC

T_s = - Log absorbansi sampel

T_s = Antilog $A_{s\text{ sampel}}$

$A_{s\text{ sampel}} = A_{s\text{ uji}} - A_{s\text{ blanko}}$

- Kurva regresi linear dimasukkan kedalam persamaan berikut (Amilin, 2018):

$$y = a + bx$$

Keterangan

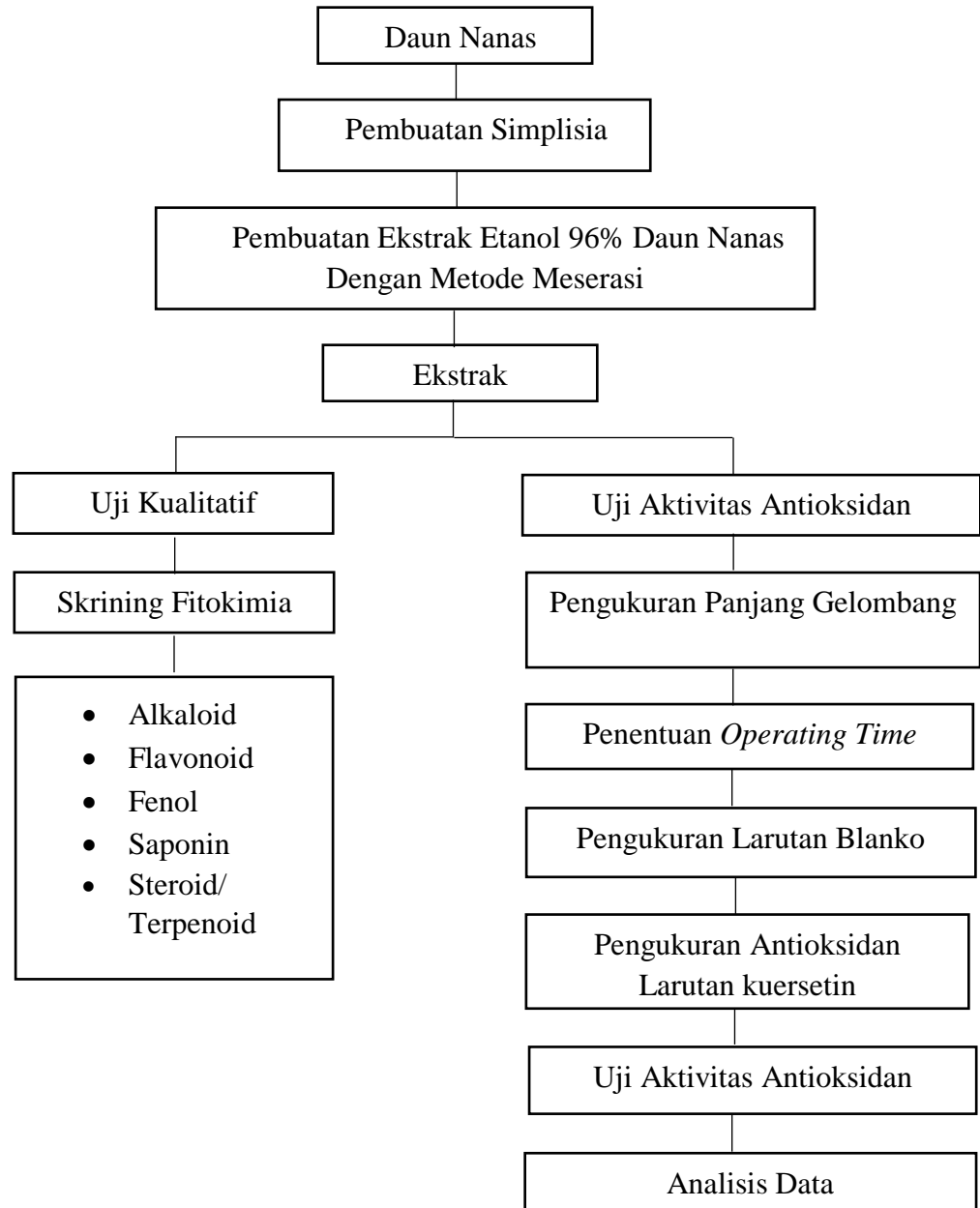
x = Konsentrasi (ppm)

y = persentase kapasitas (%)

- Nilai EC_{50} dihitung menggunakan persamaan berikut (Amilin, 2018):

$$EC_{50} = \frac{(50 - A)}{B}$$

3.7. Kerangka Penelitian



Gambar 4. Kerangka penelitian