

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental. Penelitian eksperimental dilakukan di laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun nanas (*Ananas comosus* (L.) menggunakan metode ABTS (2,2-azinobis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonate).

3.2 Waktu, Lokasi dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian di Laboratorium Bahan Alam dan Kimia Farmasi Universitas Borneo Lestari dari bulan Februari sampai Juni 2024.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak metanol daun nanas (*Ananas comosus* (L.)

3.3.2 Variabel terikat : Persentase (%) peredaman radikal bebas ABTS dan Nilai IC₅₀

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

gelas ukur (Pyrex[®]), mikropipet (Dragonlab[®]), , tabung reaksi(Pyrex[®]), timbangan analitik (Fujitsu[®]), stopwatch, gelas beker (Pyrex[®]), spatula, spektrofotometer UV-Vis (PG Instrument T60[®]), vial gelap, Vortex (Bionex[®]), *waterbath* (Mettler[®]), *rotary evaporator* (IKARVIO[®]).

3.4.2 Bahan

Daun nanas yang di peroleh dari Daerah Tamban (Kalimantan Selatan), *aquadest* (*Onemed*[®]), amil alcohol (C₅H₁₁OH), pereaksi *Mayer*, asam asetat anhidra (C₄H₆O₄) (*Merck*[®]), asam sulfat (H₂SO₄)(*Smart-Lab*[®]), pereaksi *Dragendorff*, reagen ABTS (*Sigma-aldrich*[®]), metanol (*Onemed*[®]), Kalium persulfate (K₂S₂O₈) (*Sigma-aldrich*[®]), kertas label, kuersetin (*Merck*[®]), kertas saring, asam klorida pekat (HCl) (*Merck*[®]), etanol p.a (*Merck*[®]), kloroform (HCl₃) (*Merck*[®]), (*Merck*[®]), magnesium (Mg) (*Merck*[®]), pereaksi *Wagner* dan simplisia daun nanas, gelatin, dan larutan besi (III) klorida (FeCl₃).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengambilan Tumbuhan

Tumbuhan nanas diperoleh dari daerah tamban, Mekarsari, Barito Kuala, Kalimantan Selatan, Bagian daun yang berwarna hijau tua, dengan jumlah sebanyak 5 kg yang digunakan penelitian ini (Puspitasari & Desrita, 2018).

3.5.2 Determinasi

Determinasi tumbuhan dilakukan dengan mengirimkan seluruh bagian dari tumbuhan nanas (*Ananas comosus* (L.) ke Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru.

3.5.3 Pembuatan Simplisia

Pertama mengumpulkan bahan, pemilihan bahan basah, pencucian, perajangan, pengeringan, pemilihan bahan kering, penyerbukan, penyimpanan, seta pewadahan. Langkah-langkah dalam pembuatan simplisia sebagai berikut: pertama, daun segar dikumpulkan sebanyak 4 kg, selanjutnya dilakukan pemilihan bahan dan pencucian sampai bersih. Selanjutnya, ukuran daun diperkecil untuk mempercepat proses pengeringan. Metode Pengeringan dengan kering angin. Setelah daun kering, dilakukan pemilihan daun kering untuk memastikan simplisia bersih dan bebas dari kotoran. Terakhir, daun yang sudah kering dihancurkan menggunakan *blender* (Megawati, 2014). Pembuatan serbuk simplisia dari simplisia kering yang telah di buat dengan derajat kehalusan serbuk kasar dengan *mesh* no. 40 (Pujiastuti & El'Zeba, 2021).

Untuk menghitung persentase rendemen dapat digunakan rumus:

$$\text{Persentase simplisia} = \frac{\text{bobot simplisia}}{\text{bobot bahan baku}} \times 100\%$$

3.5.4 Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 200 gram serbuk daun nanas diambil dan dimaserasi dengan 2 liter larutan metanol selama 3 hari pada suhu kamar, terlindung sinar matahari (Deniansyah & Pujiastuti, 2021). Larutan yang sudah tercampur tersebut diaduk sesekali pada 6 jam pertama, kemudian diistirahatkan selama 24 jam. Lakukan pemisahan maserasi menggunakan metode filtrasi. Dilakukan proses pengulangan penyaringan sebanyak dua kali menggunakan pelarut yang sama sebelumnya, dengan takaran volume 1 L. Semua maserat yang sudah di filter digabung dan dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

Prosedur pemekatan simplisia dilakukan dengan menguapkan maserat yang tersisa pada atas penangas dengan suhu 50°C hingga didapat ekstrak yang kental. Proses penguapan dihentikan ketika maserat terlihat kental secara visual dan kadar air ekstrak tidak melebihi ketentuan yang ada yaitu 10%. Ekstrak kental daun nanas kemudian dihitung % rendemen (Deniansyah & Pujiastuti, 2021).

Rendemen ekstrak dapat di hitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapatkan}}{\text{bobot simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

3.5.5 Skrining Fitokimia

Untuk melakukan skrining fitokimia dan uji identifikasi senyawa tanin, flavonoid, saponin, fenol, triterpenoid dan steroid, langkah pertama adalah melakukan pengenceran. Sebanyak 0,5 gram ekstrak kental daun nanas (*Ananas comosus L. Merr*) ditimbang dan dilarutkan dalam 5 mL

aquadest di dalam gelas beaker, kemudian dilakukan proses identifikasi (Kasitowati *et al.*, 2017).

a. Alkaloid

Ekstrak kental daun nanas 0,5 gram ditimbang dan larutkan dalam kloroform dan amonia, kemudian disaring. Hasil saringan atau filtrat yang diperoleh ditambahkan dengan Asam Sulfat (H_2SO_4) 2N, lalu campuran tersebut diguncang sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan yang diambil yaitu lapisan atas dan diuji menggunakan reagen Dragendorff, Wagner, dan Mayer. Ekstrak dinyatakan positif mengandung alkaloid jika terjadi endapan cokelat kemerahan pada reagen Dragendorff dan Wagner, serta endapan putih pada reagen Mayer (Rosmainar, 2018).

b. Fenol

Sebanyak 1 ml sampel yang telah disiapkan kemudian tambahkan larutan $FeCl_3$ 1% beberapa tetes. Perubahan warna menjadi hijau tua positif keberadaan senyawa fenolik (Gabriella Yorin Damayanti, 2020).

c. Flavonoid

1 ml larutan sampel yang telah disiapkan kemudian tambahkan magnesium, kemudian ditetesi dengan HCl 2N dan amil alkohol ke dalam tabung reaksi. Keberadaan flavonoid akan terindikasi secara positif dengan perubahan warna dari kuning hingga merah (Azalia. D *et al.*, 2023)

d. Saponin

Larutkan ekstrak dengan 10 ml air panas, dibiarkan sebentar dan dikocok kuat kurang lebih 10 detik. Saponin positif setelah penambahan 1 tetes HCl 2N pada busa dengan tinggi 1-10 cm yang tidak mengalami perubahan dalam waktu 10 menit (Supomo *et al.*, 2016).

e. Triterpenoid dan Steroid

Larutkan ekstrak pada 2 ml kloroform, tambahkan asam asetat 10 tetes dan teteskan asam sulfat pekat. Campuran tersebut kemudian dikocok dan diamkan beberapa menit. Kemunculan warna merah atau ungu mengindikasikan keberadaan terpenoid, sementara warna biru atau hijau menunjukkan keberadaan steroid (Tonius *et al.*, 2016).

3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan**1. Pembuatan Larutan****a. Pembuatan Larutan ABTS**

Membuat larutan ABTS, serbuk ABTS sebanyak 18 mg dan serbuk kalium persulfat sebanyak 3,5 mg ditimbang kemudian larutkan dengan 5 mL aquadest. Campuran ini diinkubasi dalam kegelapan 16 jam. Setelah itu, larutan-larutan tersebut dicampur dan volumenya disesuaikan dengan etanol p.a. hingga mencapai volume total 25 mL. (Jatmiko. 2021).

b. Pembuatan Larutan Blanko ABTS

Larutan ABTS 1 ml diambil dan 5 ml etanol p.a ditambahkan dalam vial. kemudian ukur campuran larutan tersebut menggunakan

spektrofotometer Uv-Vis Panjang gelombang 500 – 800 nm (Putri Jatmiko & Mursiti, 2021).

c. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Pembuatan larutan induk kuersetin 1000 µg/ml, pertama menimbang 10 mg kuersetin dan larutkan dalam etanol p.a. 10 ml pada tanda batas labu ukur. Selanjutnya, dilakukan pengenceran dari larutan tersebut dengan konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya, dibuat larutan-larutan dengan berbagai konsentrasi dari 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, dan 4 ppm. (Jatmiko & Mursiti, 2021).

d. Pembuatan Larutan Ekstrak Metanol Daun Nanas

Ekstrak daun nanas sebanyak 100 mg ditimbang dan tambahkan 100 ml etanol pro analisis dalam labu ukur, menghasilkan larutan berkonsentrasi 1000 ppm. Larutan tersebut dilakukan pengenceran menjadi 100 ppm dengan cara ambil 5 ml larutan tersebut kemudian tambahkan 50 ml etanol pro analisis dalam labu ukur. Selanjutnya, dibuat beberapa konsentrasi lainnya yaitu 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, dan 300 ppm (Pratiwi *et al.*, 2017).

2. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pengukuran Gelombang Serapan ABTS

Larutan ABTS 1 mL diambil dan menambahkan etanol pro analisis hingga volumenya mencapai 25 mL dalam labu ukur.

Kemudian, mengukur absorbansi larutan dengan panjang gelombang 500-800 nm sebagai penentuan panjang gelombang optimum dalam analisis aktivitas antioksidan (Wicaksono, 2020).

b. Penentuan *Operating Time*

Diambil sebanyak 1 mL larutan standar kuersetin dari larutan standar kuersetin 3 ppm, dan tambah 1 mL larutan radikal ABTS. Absorbansi larutan diukur dengan panjang gelombang maksimum yang sudah ditentukan setiap interval 1 hingga 60 menit sampai nilai absorbansi tetap konsisten (Wicaksono, 2020).

c. Penentuan Aktivitas Antioksidan Metode ABTS Dengan Kuersetin

Siapkan larutan standar kuersetin dari larutan kuersetin 100 ppm pada konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, dan 4 ppm, atau 50 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, dan 0,4 ml. Labu takar 10 ml dengan pipet ml. Selanjutnya tambahkan etanol. Sampai batas labu takar tercapai. Selanjutnya ambil 1 ml larutan dan 1 ml larutan radikal ABTS ditambahkan. Larutan diinkubasi selama 40 menit sesuai waktu operasi yang ditentukan dan ukur serapannya pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Faisal, 2019).

d. Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Pengujian Antioksidan dengan menambahkan 4 ml ekstrak dengan konsentrasi larutan uji (100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250

ppm, 300 ppm) ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 1 mL larutan ABTS dan dikocok hingga homogen, kemudian ditutup dengan *aluminium foil*. Dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu kamar selama periode pengoperasian yang ditentukan. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang tertentu (Prasetyo *et al.*, 2021); (Bahriul *et al.*, 2014).

e. Pengukuran Aktivitas Penghambatan Radikal Bebas ABTS Dengan Larutan Ekstrak

Larutan induk ekstrak 1000 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg ekstrak dan melarutkannya dalam etanol sampai 10 mL pada labu takar. Kemudian ekstrak diencerkan hingga beberapa konsentrasi dengan menambahkan etanol sesuai data optimasi yang diperoleh. Kemudian tambahkan 1 ml larutan ABTS pada setiap larutan. Kemudian diinkubasi di tempat bebas cahaya selama waktu yang sudah ditentukan dan pengukuran serapan pada panjang gelombang maksimum yang sudah ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Magfira, 2018); (Mokoginta *et al.*, 2020).

3.6 Analisis Data

Analisis data antioksidan menggunakan metode ABTS yaitu kemampuan campuran antioksidan dalam suatu sampel dalam menetralkan radikal bebas dengan menyumbangkan proton. Dari hasil pengujian antioksidan larutan sampel dengan antioksidan pembanding kuersetin dalam menangkalkan radikal bebas dengan metode ABTS yang telah didapatkan nilai

absorbansi pada masing- masing konsentrasi, dihitung nilai % inhibisi atau dilakukan pengukuran persentase perendam aktivitas antioksidan dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_o - A_s}{A_o} \times 100 \%$$

Keterangan:

A_o = Absorbansi blanko (tidak mengandung sampel)

A_s = Absorbansi sampel ekstrak yang telah ditambahkan ABTS

Setelah dilakukan perhitungan persentase inhibisi selajutnya hasil tersebut dimasukkan dalam persamaan regresi linier yang nantinya akan menghitung nilai = IC_{50} . Kurva persamaan ini yaitu:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

x = Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)

y = persentase peredaman (%)

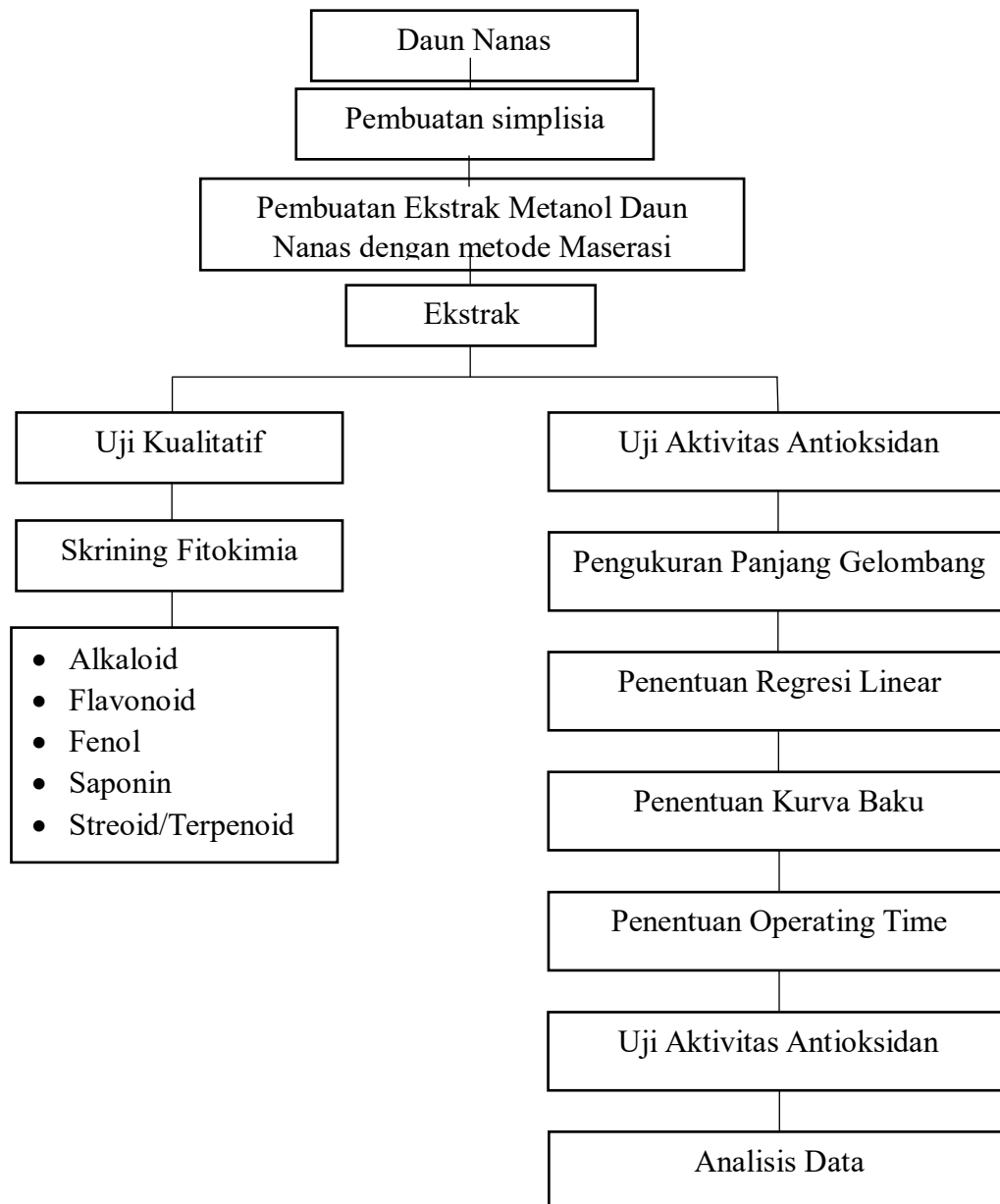
a = Intersep

b = Slope

(Puspitasari *et al.*, 2019)

Penentuan nilai x dalam konteks ini mengacu pada konsentrasi sampel (dalam $\mu\text{g/mL}$) atau nilai IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi dari sampel yang dibutuhkan untuk menetralsir 50% radikal bebas dalam uji aktivitas antioksidan.

3.7 Kerangka Penelitian



Gambar 3. Kerangka Penelitian