

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Rencana Penelitian

Rancangan Penelitian yang digunakan untuk penelitian ini yaitu eksperimental secara *in vitro* yang bertujuan menguji aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun nanas (*Ananas comosus* L.Merr) dengan menggunakan metode CUPRAC.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari hingga Juni 2024. Tempat yang digunakan untuk penelitian adalah laboratorim Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Borneo Lestari.

3.3. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak metanol daun Nanas (*Ananas comosus* L.Merr)
2. Variabel terikat : nilai EC_{50} dari aktivitas antioksidan

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas (*Pyrex*, *Iwaki*), alumunium foil, batang pengaduk, cawan penguap, maserator, mikropipet (*Dragonlab*), *blender*, *rotary evaporator* (*IKARV10*®), sendok tanduk, spektrofotometer UV-Vis (*Dlab*), timbangan analitik (*Fujitsu*®), kuvet, waterbath (*Memmert*®).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini aquadest (*Waterone*TM), Amoniak (*Emsure*®), amil alkohol (*Emsure*®), Metanol, pereaksi *Dragendorff* (*Nitrat kimia*), pereaksi *Liebermann-Burchard* (*Nitrat kimia*), pereaksi *Mayer* (*Nitrat Kimia*), pereaksi *Wagner* (*Nitrat kimia*), FeCl₃ (PT.kimia jaya), serbuk magnesium (*Nitrat kimia*), HCl pekat (*Nitrat kimia*), H₂SO₄ (*Nitrat kimia*), kloroform (*Nitrat kimia*), kuersetin (*Sigma*), CuCl₂·2H₂O (*Pudak*), amonium asetat (NH₄Ac) (*Pudak*), *Neocupproine* (Nc) (*Merck*). Simplisia yang digunakan daun nanas.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Tumbuhan

Tumbuhan nanas diambil untuk penelitian ini adalah tumbuhan yang didapatkan di Kecamatan Mekarsari, Kabupaten Barito Kuala, Kalimantan Selatan. Bagian yang digunakan untuk penelitian ini adalah bagian daun nanas (*Folium*).

3.5.2. Determinasi Sampel

Determinasi sampel dilakukan dengan cara mengambil bagian daun dari tumbuhan Nanas (*Ananas comosus* L.Merr) untuk dibuat herbarium lalu dideterminasi di Laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.5.3. Pembuatan Simplisia Daun Nanas (*Ananas comosus* L.Merr)

Daun Nanas sebanyak 1000 gram dalam keadaan segar, selanjutnya di sortasi basah dan dicuci, kemudian dirajang, selanjutnya dilakukan pengeringan dengan cara di jemur di bawah

matahari ditutup dengan kain hitam. Setelah kering simplisia tersebut di sortasi kering dan dihaluskan dengan cara di blender, kemudian diayak dengan ayakan *mesh* 40. Hasil ayakan disimpan dalam wadah tertutup, dijauhkan dari paparan cahaya (Silvia, 2020). Untuk menghitung persentase rendemen dapat digunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot simplisia kering}}{\text{bobot bahan segar}} \times 100\%$$

3.5.4. Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Nanas (*Ananas comosus L.Merr*)

Ekstraksi menggunakan maserasi dengan pelarut metanol. Awalnya, serbuk simplisia kering daun nanas (*Ananas comosus L.Merr*) ditimbang sebanyak 150 gram dan dilakukan maserasi dalam 1050 mL pelarut metanol dengan perbandingan (1:7). Maserasi dilakukan selama 24 jam dengan pengadukan beberapa kali lalu disaring dengan kertas saring dan remaserasi sebanyak 2 kali. Maserat berupa ekstrak cair yang yang diperoleh disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C secara perlahan untuk memisahkan ekstrak dari pelarut, selanjutnya dipekatkan diatas *waterbath* sampai mendapatkan ekstrak yang kental dan hingga mencapai bobot yang ditetapkan. (Hasim *et al.*, 2016).

Rumus perhitungan rendemen:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

3.5.5. Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,1 gram ekstrak metanol daun nanas ditambahkan dengan 10 mL kloroform dan 4 tetes NH_4OH lalu disaring. Filtrat ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes, dikocok kuat-kuat, didiamkan sampai larutan asam sulfat dan kloroform memisah. Lapisan asam sulfat diambil dan dibagi kedalam tiga tabung reaksi berbeda yang mana masing-masing sebanyak 2 mL. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer, kemudian hasil positif apabila larutan terbentuk endapan putih. Tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen Wagner, kemudian hasil positif apabila larutan terbentuk endapan jingga hingga coklat. Tabung III ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, kemudian hasil positif apabila larutan terbentuk endapan jingga (Reiza *et al.*, 2019).

b. Uji Fenol

Ekstrak metanol daun nanas sebanyak 0,1 gram dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan dengan larutan FeCl_3 10% sebanyak 2 tetes. Sampel ekstrak terindikasi positif mengandung fenol jika terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam (Agustina *et al.*, 2017).

c. Uji Flavonoid

Ekstrak metanol daun nanas sebanyak 0,1 gram dilarutkan kedalam pelarut, selanjutnya ditambahkan 1 mL logam magnesium, HCl 1 mL dan 1 mL amil alkohol ke dalam tabung reaksi. Sampel ekstrak terindikasi positif mengandung flavonoid jika menimbulkan warna merah, kuning ataupun jingga (Nugrahani *et al.*, 2016).

d. Uji Saponin

Ekstrak metanol daun nanas sebanyak 0,1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquades sebanyak 10 mL. Kemudian dikocok selama 10 detik lalu dibiarkan selama 10 menit, setelah itu ditambahkan dengan 1 mL HCl 2 N. Sampel ekstrak terindikasi positif mengandung saponin apabila buih terbentuk stabil setelah ditambahkan dengan HCl 2 N (Nathania *et al.*, 2020).

b. Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak metanol daun nanas sebanyak 0,1 gram sampel dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan dengan 2 mL kloroform, 10 tetes asam asetat anhidrat dan 3 tetes H_2SO_4 pekat (pereaksi LiebermanBurchard) melalui dinding tabung reaksi. Sampel ekstrak terindikasi positif mengandung steroid apabila terbentuknya warna biru-hijau dan mengandung triterpenoid apabila terbentuk warna merah atau ungu (Purwaniati *et al.*, 2020).

3.5.6. Uji Aktivitas Antioksidan

1. Pembuatan Larutan

a. Pembuatan larutan untuk pengujian CUPRAC

Larutan CuCl_2 dibuat dengan menimbang 0,4262 gram $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam air dan diencerkan sampai 25 ml, ammonium asetat pH 7 dibuat dengan melarutkan 1,927 gram NH_4Ac pada labu ukur 25 ml dan ditambah aquades sampai tanda. Larutan *neocupproine* (Nc) 0,0075 M disiapkan dengan melarutkan 0,039 gram pada labu ukur ukuran 25 mL dan diencerkan sampai tanda menggunakan etanol p.a (Maryam *et al.*, 2016).

b. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Larutan stok kuersetin 1000 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg kuersetin yang dimasukkan ke labu ukur 10 mL. Etanol p.a kemudian ditambahkan sampai tanda batas. Larutan induk ini selanjutnya diencerkan menjadi 100 ppm dengan cara mengambil larutan induk dengan pipet sebanyak 1 mL yang diencerkan dengan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 10 mL. Setelah itu, dibuat beberapa varian konsentrasi yaitu 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm. Dibuat dengan cara memipet larutan induk kuersetin 100 ppm sebanyak 100 μl ; 200 μl ; 300 μl ; 400 μl dan 500 μl untuk dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang terpisah. Masing-masing labu ukur ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas (Haeria, 2013).

c. Pembuatan Larutan Ekstrak Metanol Daun Nanas

Ekstrak metanol daun nanas 10 mg dilarutkan dengan etanol *p.a* dalam labu ukur 10 mL, sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut, dibuat beberapa konsentrasi menjadi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm dengan memipet larutan induk 1000 ppm masing-masing pada labu ukur 10 ml kemudian ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas (Suryani *et al.*, 2023).

2. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum CUPRAC

Pengukuran dilakukan dengan cara membuat larutan terlebih dahulu dengan mencampurkan larutan 1 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, dan 1 mL *neocupproine* 0,0075 M, dan 1 ml buffer ammonium asetat dan ditambahkan 0,1 mL aquades dalam vial. Vial selanjutnya diinkubasi selama 60 menit. Selanjutnya, larutan kemudian dituangkan kedalam kuvet dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 400-600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Haeria, 2013).

b. Pengukuran Larutan Blanko CUPRAC

Larutan blanko Larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, *neocupproine* 0,0075 M, buffer amonium asetat 1 M, etanol *p.a* masing-masing diambil 1 mL untuk dimasukkan pada vial dan ditambah 0,1 mL aquades. Vial selanjutnya diinkubasi dalam

ruangan gelap selama 60 menit. Larutan CUPRAC yang sudah jadi ini dituangkan kedalam kuvet dan dibaca serapan maksimumnya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum yang didapat (Sayakti, 2022).

c. Pengukuran Antioksidan Larutan kuersetin

Larutan Kuersetin (kontrol positif) diambil sebanyak 1 mL dari berbagai konsentrasi kemudian dimasukkan ke dalam vial. Semua vial ditambahkan 1 ml larutan 0.01 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 ml *neocupproine* 0,0075 M, 1 ml buffer amonium asetat 1 M dan ditambah 0,1 mL aquades. Vial selanjutnya diinkubasi dalam ruangan gelap selama waktu stabil yang didapatkan dari penentuan *operating time*. Selanjutnya, larutan dituangkan ke dalam kuvet dan diukur serapan maksimumnya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Sayakti, 2022).

d. Pengukuran Antioksidan Larutan Ekstrak Metanol Daun Nanas

Masing-masing konsentrasi larutan ekstrak metanol daun nanas dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan kedalam vial dan ditambah 1 mL larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 M, 1 mL neokuproin etanoik 0,0075 M, 1 mL buffer amonium asetat 1 M, kemudian ditambahkan 0,1 mL aquades. Inkubasi selama waktu *operating time* yang didapat pada suhu ruangan, kemudian absorbansi ditentukan menggunakan spektrofotometer

UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Haeria, 2013).

e. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Daun Nanas

Besarnya aktivitas antioksidan daun nanas dinyatakan dengan nilai EC_{50} yang diperoleh dengan cara membuat regresi linear dari konsentrasi ekstrak terhadap %kapasitas. Aktivitas antioksidan diukur sebagai persen kapasitas sampel uji dengan menggunakan persamaan (amilin, 2018).

Rumus :

$$Abs_{sampel} = Abs_{Uji} - Abs_{blanko}$$

$$Abs_{sampel} = -\text{Log } Ts$$

$$Ts = \text{Antilog } Abs_{sampel}$$

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

Keterangan :

%kapasitas = %kapasitas CUPRAC

Ts = -Log absorbansi sampel

As = Absorbansi sampel uji setelah penambahan larutan uji CUPRAC

Kurva regresi linear didapatkan dari perhitungan antara konsentrasi sampel % vs kapasitas CUPRAC

$$y = a + bx$$

Keterangan :

x = konsentrasi (ppm)

y = prentase kapasitas (%)

Dari persamaan diatas, nilai EC_{50} dapat dihitung menggunakan persamaan :

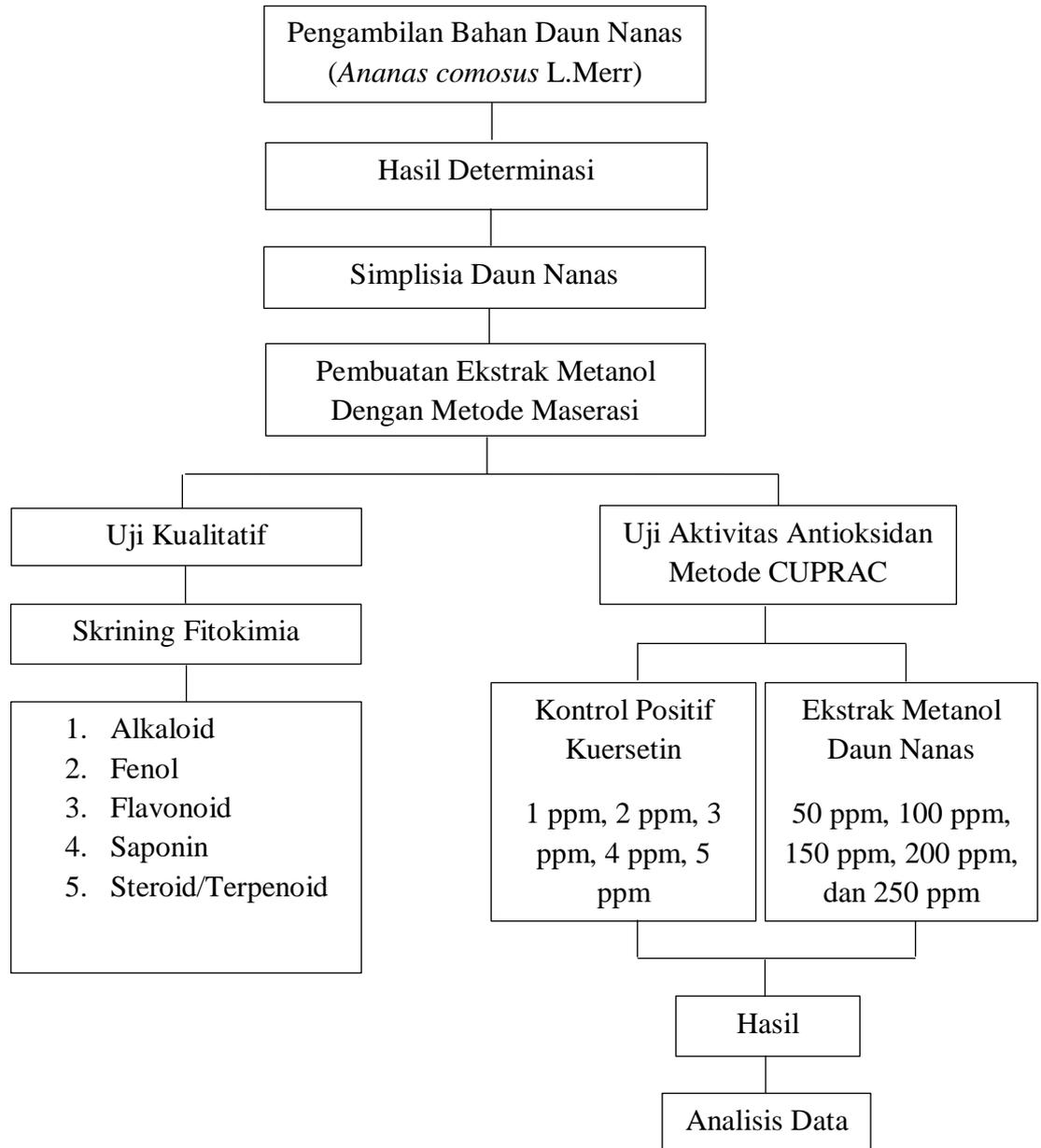
$$EC_{50} = \frac{(50-a)}{b}$$

3.6. Analisis Data

Analisis data dari hasil pengujian antioksidan larutan sampel dalam menangkal radikal bebas dengan metode cuprac yang telah didapatkan nilai absorbansi, kemudian ditentukan persamaan regresi linear ($y = a + bx$),

dimana x adalah konsentrasi dan y adalah persentase inhibisi. Aktivitas antioksidan dinyatakan *Efficiency Concentration* (EC_{50}). Nilai EC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti $y = 50$. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila ($EC_{50} < 50$ ppm), kuat ($EC_{50} 50 - 100$ ppm), sedang ($EC_{50} 101 - 250$), lemah ($EC_{50} 250 - 500$) dan sangat lemah ($EC_{50} > 500$ ppm). Semakin kecil nilai EC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin besar (Rosidah & Tijtraesmi, 2017).

3.7. Kerangka Penelitian



Gambar 1. Alur Penelitian