# BAB IIIMETODE PENELITIAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Dengan tahapan pengumpulan sampel yaitu buah nanas segar dan keripik nanas, pengelolaan sampel, skrining fitokimia, uji kualitataif vitamin C, uji penetapan kadar vitamin C dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan spektrofotometri UV-Vis.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdapat dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah pengujian kadar vitamin C dan antioksidan pada buah nanas segar dan keripik nanas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah uji kualitatif vitamin C dan uji penetapan kadar vitamin C dan penentuan nilai $IC\_{50} $antioksidan dengan uji kuantitatif.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter yang dilakukan pada panelitian ini yaitu untuk mengidentifikasi kadar vitamin C dan aktivitas antioksidan yang terdapat dalam buah nanas segar dan keripik nanas dengan melakukan uji skrining fitokimia yang meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji tanin, uji saponin, uji steroid/ tripenoid dan uji glikosida. Uji kualitatif vitamin C yang meliputi uji dengan pereaksi benedict, metilen blue dan amonium molibdat. Penetapan kadar vitamin C menggunakan spektrofotometri ultraviolet, pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2-2-*Diphenyl-1-Picryhidrazyl*). Kemudian dilanjutkan dengan melakukan analisis kadar dengan menggunakan metode spektrofotometri visible.

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al Washliyah Medan pada bulan maret sampai dengan bulan juni 2024.

## 3.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Buah nanas *(Ananas comosus* (L.) Merr) segar dan keripik nanas, asam askorbat, asam klorida, pereaksi bouchardat, pereaksi mayer, pereaksi dragendrof, etanol, NaOH, HCl, FeCl3, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, aquadest, metanol pa, Larutan DPPH, pereaksi Metilen blue, Benedict dan amonium molibdat.

## 3.4 Alat

Alat yang digunakan meliputi Spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*), blender, Erlenmeyer, Gelas ukur, beakel gelas, kuvet, Batang pengaduk, Labu ukur, Pipet tetes, Bola hisap, Pipet volume, Corong, Mat pipet, Neraca analitik dan aluminium foil.

## 3.5 Penyiapan Sampel

### 3.5.1 Pengambilan Sampel

Metode pengambilan sampel dilakukan dengan cara *random sampling,* sampel diambil pada berberapa tempat atau daerah dikarenakan agar dapat dilihat perbedaannya dengan daerah lain. Sampel diambil dari aceh tenggara, serdang bedagai, deli serdang dan berastagi.

### 3.5.2 Derteminasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di *Herbarium Medanense* (MEDA) Universitas Sumatera Utara terhadap Buah Nanas *(Ananas comosus (L.)* Merr) yang diteliti. Tujuan determinasi dari suatu tanaman adalah untuk memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan dalam penelitian sehingga kesalahan dalam pengumpulan bahan dapat dihindari.

### 3.5.3 Pembuatan Keripik Nanas

Sampel buah nanas dikupas lalu dicuci kemudian diiris tipis dengan ketebalan sekitar 2-3 mm, setelah itu dimasukkan kedalam oven kemudian diatur suhunya menjadi 100 – 110 ºC selama 1 jam (Saputra, 2020).

### 3.5.4 Pengolahan Sampel

1. **Sampel nanas segar**

Nanas segar dipotong kecil-kecil lalu dihaluskan dengan blender tanpa penambahan air. Kemudian disaring menggunakan kain planel untuk kemudian selanjutnya dilakukan Pemeriksaan golongan senyawa kimia, analisis kualitatif, dan identifikasi lanjutan untuk penetapan kadar vitamin C dan aktivitas antioksidan dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

1. **Sampel Keripik Nanas**

Keripik nanas dipotong kecil-kecil lalu dihaluskan dengan blender. Kemudian dilarutkan dengan aquadest lalu disaring menggunakan kain planel untuk selanjutnya di lakukan pemeriksaan golongan senyawa kimia, analisis kualitatif, dan identifikasi lanjutan untuk penetapan kadar vitamin C dan aktivitas antioksidan dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

## 3.6 Pembuataan Larutan Pereaksi

### 3.6.1 Pembuatan Larutan Bouchardat

Sebanyak 4 gram kalium iodida dilarutkan dalam 20 mL aquadest, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 gram iodium dan dicukupkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes, 1989).

Sebanyak 1,36 gram raksa (II) klorida, dilarutkan dalam 60 mL aquadest, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 gram kalium iodida lalu dilarutkan dalam 10 mL aquadest. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan aquadest hingga diperoleh larutan 100 mL (Depkes, 1989).

### 3.6.2  Larutan Pereaksi Dragendorff

Sebanyak 8 g bismut (II) nitrat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 gram kalium iodida lalu dilarutkan dalam 50 mL aquadest. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes, 1989).

### 3.6.3 Larutan Pereaksi Molish

Sebanyak 3 gram alfa-naftolditambahkan beberapa tetes etanol kemudian dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 mL (Depkes, 1989).

### 3.6.4 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N

Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dalam aquadest hingga 100 ml (Depkes, 1989).

### 3.6.5 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2Ng

Sebanyak 5,4 mL asam sulfat pekat diencerkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes, 1989).

### 3.6.6 Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2N

### Sebanyak 8 gram pellet natrium hidroksida dilarutkan dalam aquadest hingga 100 mL (Depkes, 1989).

### 3.6.7 Larutan Pereaksi Liberman- burchard

Sebanyak 20 bagian asam asetat anhidrat dicampurkan dengan 1 bagian asam sulfat pekat dan 50 bagian kloroform. Larutan pereaksi harus dibuat baru (Harborne, 1987).

### 3.6.8 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida

Sebanyak 1 gram besi (III) klorida dilarutkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes, 1989).

## 3.7 Skirining Fitokimia

### 3.7.1 Pemeriksaan Alkaloid

 Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dipakai untuk uji alkaloida, diambil 3 tabung reaksi, lalu kedalamnya dimasukkan 0,5 ml filtrat. Masing- masing tabung reaksi ditambahkan pereaksi yang berbeda.

1. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer, reaksi posinif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning.
2. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi bouchardat, reaksi postif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam
3. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendorff, reaksi postif ditandai dengan terbentuknya endapan warna merah atau jingga.

Alkaloid positif jika terjadi endapan atau kekeruhan pada paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

**3.7.2 Pemeriksaan Saponin**

Ditimbang sampel sebanyak 0,5 g dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan kocok selama 10 detik. Jika terbentuk buih setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

**3.7.3 Pemeriksaan Tanin**

Sampel ditimbang 0,5 gram lalu sampel disari dengan 10 ml. aquadest, kemudian filtratnya diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Diambil 2 ml. larutan lalu ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Terjadinya warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Depkes RI, 1995).

**3.7.4 Pemeriksaan Steroid/ terpenoid**

Dihaluskan 0,5 g sampel, ditambahkan 10 ml klroform, dikocok dan disaring filtratnya, ditambahkan 10 tetes asam asetat glasial pada filtrat uji, lalu ditambahkan 10 tetes H2SO4, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi, Jika terbentuk warna hijau/biru kehijauan menunjukkan adanya senyawa golongan steroid dan jika terbentuk warna merah atau merah keunguan menunjukkan adanya senyawa golongan triterpenoid (Srinengri, 2019).

**3.7.5 Pemeriksaan Flavonoid**

Sampel ditimbang 10 g kemudian ditambahkan 100 mL air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning dan jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1995).

### 3.7.6 Pemeriksaan Glikosida

Sampel masing-masing ditimbang sebanyak 3 gram, kemudian disari dengan 30 ml campuran 7 ml bagian etanol 95 % P dan 3 bagian volume air dalam alat pendingin alir balik selama 10 menit, dinginkan, saring. Diambil 20 ml filtrat ditambahkan 25 ml aquades dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 ml campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol yang dilakukan berulang sebanyak tiga kali pengulangan. Kumpulan sari air diuapkan pada temperature tidak lebih dari 50°C. Sisanya dilarutkan dalam 2 ml methanol P. Kemudian diambil 0,1 ml larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi, diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes molis. Tambahkan hati-hati 2ml asam sulfat P melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1995).

## 3.8 Uji Kualitatif Vitamin C

### 3.8.1 Pemeriksaan Vitamin C pada sari buah dan keripik buah nanas dengan Pereaksi ammonium molibdat 5%

 Sampel direaksikan dengan pereaksi ammonium molibdat 5% dengan ditambahkan setetes demi setetes. Sampel akan membentuk warna biru molibden jika positif mengandung vitamin C.

### 3.8.2 Pemeriksaan Vitamin C pada sari buah dan keripik buah nanas dengan Pereaksi Benedict

Sampel dipipet 5 ml lalu dimasukkan dalam tabung tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi benedict sebanyak 15 tetes, kemudian tabung reaksi dipanaskan diatas bunsen hingga mendidih kurang lebih sekitar 2 menit hingga didapatkan warna hijau kekuningan atau merah bata (jika positif mengandung vitamin C).

### 3.8.3 Pemeriksaan Vitamin C pada sari buah dan keripik buah nanas dengan Pereaksi Metilen Blue

Sebanyak 2 ml larutan sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 4 tetes larutan metilen biru kemudian dihangatkan hingga 40º C. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna biru tua yang dalam waktu 3 menit berubah warna biru muda atau hilang.

## 3.9 Penetapan Kadar Vitamin C

### 3.9.1 Pembuatan Larutan Induk Baku Vitamin C BPFI

Ditimbang dengan saksama 50 mg asam askorbat baku Pembanding, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 ml, dilarutkan dengan aquades, di kocok sampai larut lalu dicukupkan dengan akuades sampai garis tanda (500 μg/ml) - LIB I. Dari larutan LIB I dipipet 5 ml dimasukkan ke dalam labu tentukur 25 ml, ditambahkan dengan akuades sampai garis tanda (100 μg/ml) - LIB II(Leo, 2022).

### 3.9.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Vitamin C

Dari LIB II (100 μg/ml) dipipet 4 ml, dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 ml dan dicukupkan dengan akuades sampai garis tanda lalu dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 8 μg/ml. Kemudian larutan ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang 200-400 nm (Leo, 2022).

### 3.9.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Dipipet dari LIB II 100 ppm kedalam labu ukur 10 ml masing-masing sebesar sebesar 0,06 ml, 0,1 ml, 0,14 ml, 0,18 ml, 0,2 ml (3 ppm, 5 ppm, 7 ppm, 9 ppm, dan 10 ppm). Kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas lalu dihomogenkan dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Leo, 2022).

### 3.9.4 Penetapan Kadar Vitamin C

Sebanyak 2,5 g sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, lalu ditambahkan akuades sampai tanda batas kemudian dihomogenkan dan disaring dengan kain planel menjadi LIB 1 (50.000 mcg/ml). Dipipet dari LIB 1 sebanyak 5 ml masukkan ke dalam labu ukur 25 ml, tambahkan akuades hingga tanda batas menjadi LIB II (10.000 mcg/ml). Selanjutnya, diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang dilakukan 6 kali pengulangan untuk tiap sampel (Leo, 2022).

## 3.10 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

### 3.10.1 Pembuatan larutan induk baku DPPH

Ditimbang 10 mg DPPH dimasukkan kedalam labu tentukur 50 ml kemudian dilarutkan dengan metanol dan dicukupkan sampai garis tanda, hingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 200 µg/ml.

### 3.10.2 Pembuatan Blanko DPPH

Larutan baku DPPH konsentrasi 200 µg/ml di pipet sebanyak 1 ml, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 ml dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda, sehingga didapat (Konsentrasi 40 µg/ml). Larutan disimpan ditempat yang terlindung dari cahaya.

### 3.10.3 Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Larutan DPPH konsentrasi 200 µg/ml di pipet sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 ml dilarutkan dengan metanol dan dicukupkan sampai tanda batas (konsentrasi 40 µg/ml), lalu dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur sarapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Visible sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum DPPH.

### 3.10.4 Penentuan *Operating Time*

 Larutan DPPH konsentrasi 200 µg/ml di pipet sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 ml dilarutkan dengan metanol dan dicukupkan sampai tanda batas (konsentrasi 40 µg/ml), kemudian larutan diukur absorbansinya tiap menit pada panjang gelombang maksimum selama 60 menit hingga memperoleh absorbansi yang stabil.

### 3.10.5 Penentuan Aktivitas Antioksidan Pada Sampel

 Ditimbang sampel sebanyak 2,5 g dimasukkan kedalam labu 25 ml dicukupkan dengan methanol pa sampai tanda batas (konsentrasi 100.000 µg/ml). Kemudian dipipet dari LIB II masing masing sebanyak 0,05 ml, 0,25 ml, 0,45 ml, 0,65 ml, 0,85 ml dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 ml. Kedalam masing masing labu tentukur di tambahkan 1ml larutan DPPH konsentrasi 200µg/ml lalu dicukupkan dengan methanol Pa sampai garis tanda diperoleh konsentrasi larutan uji (1000 ppm, 5000 ppm, 9000 ppm, 13000 ppm, 17000 ppm). kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 515nm. dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan.

### 3.10.6 Penentuan Persen Peredeman

Kemampuan antioksidan diukur sebagai penurunan serapan larutan DPPH (perendaman warna ungu DPPH) akibat adanya penambahan larutan uji. Nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan larutan uji tersebut dihitung sebagai peredaman.

 $ \% peredaman =\frac{A Blanko \left(DPPH\right) - A sampel}{A Blanko \left(DPPH\right)} x 100\%$

Keterangan :

A Kontrol : Absorbansi Tidak Mengandung Sampel

A Sampel : Absorbansi Mengandung Sampel

 Selanjutnya hasil perhitungan persen peredaman yang diperoleh dilakukan perhitungan persamaan garis regresi dengan konsentrasi sampel (ppm) sebagai absis (sumbu x) dan nilai peredaman sebagai koordinatnya (sumbu y) maka diperoleh persamaan garis regresi yang selanjutnya dapat dihitung kemampuan bahan uji sebagai antioksidan dengan menghitung $IC\_{50}$ mengandung rumus sebagai berikut.

 50 = ax + b

Keterangan :

50 : Kemampuan antioksidan menghambat 50% aktivitas radikal bebas

a : *Slope*

b : *Intercept*

x : Konsentrasi

### 3.10.7 Penentuan Nilai $IC\_{50}$ Antioksidan

Nilai $IC\_{50 }$merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (mampu menghambat peredaman proses oksidasi sebesar 50%). Jika nilai aktivitas antioksidan 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antioksidan sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi sampel (µg/ml) sebagai absis (sumbu x) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y). Maka diperoleh persamaan garis regresi yang selanjutnya dapat dihitung kemampuan bahan uji sebagai antioksidan dengan menghitung inhibitor concentration 50% ($IC\_{50}$).

### 3.10.8 Metode Pengolahan Data

Pengolahan data yang dihasilkan terlebih dahulu dilakukan dengan metode kurva standar, regresi linear y = ax + b dibuat berdasarkan data absorbansi dan konsenterasi dari larutan standar.