

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium yang merupakan penelitian eksplorasi. Penelitian ini menggunakan simplisia kulit nanas dan ekstrak kulit nanas yang akan dilakukan pengujian dengan pereaksi kimia. Variabel yang akan digunakan penelitian ini adalah pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana, ekstrak simplisia kulit nanas, senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, fenolik, steroid atau triterpenoid, pH ekstrak, dan penetapan flavonoid.

B. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah kulit buah nanas madu (*Ananas comosus (L.) Merr*) yang diperoleh di Bandar Lampung.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Laboratorium Farmakognosi Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk melakukan proses identifikasi tanaman, proses ekstraksi, dan uji skrining fitokimia. Waktu penelitian ini direncanakan pada bulan April sampai Juli 2024.

D. Pengumpulan Sampel

Dikumpulkan sampel kulit nanas yang didapatkan dari daerah Bandar Lampung. Kemudian setelah dikumpulkan untuk pembuatan sampel kulit nanas dilakukan sortasi basah, lalu dilakukan pengeringan, setelah pengeringan dilakukan sortasi kering dan sampel kulit nanas dihaluskan sehingga menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia yang halus digunakan untuk ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana. Kemudian hasil ekstrak dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder menggunakan metode reaksi warna. Kemudian dilakukan penetapan kadar flavonoid dengan

metode kromatografi lapis tipis, setelah dilakukannya elusi kromatografi lapis tipis data diambil berdasarkan hasil warna noda bercak dan nilai Rf yang terbentuk pada plat KLT. Data noda bercak tersebut diambil pada saat sebelum dan sesudah dilihat dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm. Kemudian dihitung rumus Rf dengan rumus berikut.

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, oven, *waterbath*, *vacuum rotary evaporator*, blender, aluminium foil, kertas saring, rak tabung reaksi, spatula, batang pengaduk, tabung reaksi, corong gelas, blub, pipet tetes, beaker glass (100 ml, 500 ml, 1000 ml), pipet volume, cawan porselen, botol kaca, plat tetes, pH meter, silica gel 60 F254, chamber, pipa kapiler, penggaris, sinar UV, gelas ukur, erlenmeyer.

b. Bahan

Kulit buah nanas, etanol 96%, etil asetat, N-Heksana, Asam klorida (HCL 2N), Pereaksi besi (III) klorida FeCl₃, Asam asetat anhidrat, pereaksi Mayer, Bouchardat, Dragendrof, asam sulfat pekat, Gelatin, NaCl, methanol, amonia dan aquadest.

2. Prosedur Kerja Penelitian

a. Identifikasi Kulit Buah Nanas

Identifikasi kulit buah nanas (*Ananas comosus (L.) Merr*) dilakukan di Laboratorium Kimia Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk mengidentifikasi sampel kulit nanas yang diambil di Bandar Lampung.

b. Pembuatan Simplisia Kulit Buah Nanas

Pembuatan simplisia kulit buah nanas (*Ananas comosus (L.) Merr*) dilakukan dengan cara :

- 1) Pengumpulan sampel kulit buah nanas
- 2) Sortasi basah untuk memisahkan kulit nanas dari kotoran atau benda lainnya
- 3) Pencucian kulit nanas dengan air yang mengalir untuk menghilangkan pengotor yang masih melekat pada kulit nanas
- 4) Perajangan kulit buah nanas supaya sampel kering secara merata
- 5) Pengeringan dibawah sinar matahari atau dalam oven dengan suhu 40°C - 60°C selama 48 jam
- 6) Sortasi kering simplisia kulit nanas untuk memisahkan kotoran lainnya yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering
- 7) Haluskan simplisia kulit buah nanas dengan blender sampai menjadi serbuk simplisia
- 8) Ayak simplisia dengan ayakan No.40 yang sudah diblender kemudian disimpan pada wadah tertutup

c. Ekstraksi Simplisia Kulit Buah Nanas

Proses ekstraksi simplisia kulit nanas (*Ananas comosus (L.) Merr*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut n-heksana yaitu :

- 1) Serbuk simplisia kulit nanas ditimbang sebanyak 100 gram dan masukan kedalam beaker glass
- 2) Tambahkan pelarut n-heksana sebanyak 1000 ml, kemudian aduk dan biarkan selama 3x24 jam dalam keadaan tertutup
- 3) Ekstrak disaring menggunakan kertas saring
- 4) Hasil filtratnya dipekatkan menggunakan *vaccum rotay evaporator*

Proses ekstraksi simplisia kulit nanas (*Ananas comosus (L.) Merr*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% yaitu :

- 1) Serbuk simplisia kulit nanas ditimbang sebanyak 100 gram dan masukan kedalam beaker glass
- 2) Tambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 ml, kemudian diaduk dan dibiarkan selama 3x24 jam dalam keadaan tertutup
- 3) Ekstrak disaring menggunakan kertas saring
- 4) Hasil filtratnya di pekatkan menggunakan vacuum rotary evaporator

Proses ekstraksi simplisia kulit nanas (*Ananas comosus (L.) Merr*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etil asetat yaitu :

- 1) Serbuk simplisia kulit nanas ditimbang sebanyak 100 gram dan masukan ke dalam beaker glass
- 2) Tambahkan pelarut etil asetat sebanyak 1000 ml, kemudian diaduk dan dibiarkan selama 3 hari dalam keadaan tertutup
- 3) Ekstrak disaring menggunakan kertas saring
- 4) Hasil filtratnya dipekatkan menggunakan *vaccum rotary evaporator*

d. Uji pH Ekstrak Kulit Buah Nanas

- 1) Uji pH timbang sebanyak 1 gram ekstrak, lakukan pengenceran dengan 10 ml aquadest
- 2) Elektroda pH meter dikalibrasi dengan indikator pH 4,00 dan 6,98
- 3) Gunakan pH meter untuk mengukur pH ekstrak
- 4) Celupkan pH meter kedalam ekstrak dan catat hasilnya

e. Skrining Fitokimia Alkaloid

- 1) Timbang ekstrak sebanyak 0,5 gram kemudian tambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling
- 2) Panaskan diatas penangas air selama 2 menit, lalu dinginkan dan disaring
- 3) Filtrat dipakai untuk percobaan berikut :
 - a) Ambil 3 tetes filtrat, lalu tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih atau kuning

- b) Ambil 3 tetes filtrat, lalu tambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat menghasilkan endapan coklat-hitam
- c) Ambil 3 tetes filtrat, lalu tambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof menghasilkan endapan merah bata
- d) Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari percobaan di atas.

f. Skrining Fitokimia Flavonoid

- 1) Sebanyak 1 gram ekstrak ditambah 10 ml air panas, kemudian dididihkan selama 10 menit dan saring dalam keadaan panas
- 2) Ambil filtrate 5 ml yang diperoleh kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg, 1 ml HCL dan 2 ml amil alkohol, lalu dikocok dan dibiarkan memisah
- 3) Flavonoid dianggap positif jika terjadi warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan amil alkohol (cincin).

g. Skrining Fitokimia Tannin

- 1) Diambil 0,5 gram ekstrak ditambahkan 10 ml air suling panas, lalu disaring
- 2) Kemudian filtrate diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna
- 3) Diambil larutan yang sudah diencerkan sebanyak 5 ml, tambahkan larutan gelatin
- 4) Tannin dianggap positif jika terbentuk endapan

h. Skrining Fitokimia Saponin

- 1) Masukkan ekstrak sebanyak 0,5 gram kedalam tabung reaksi dan tambahkan 10 ml air suling panas
- 2) Dinginkan lalu kocok kuat-kuat selama 10 detik terbentuk buih atau busa yang selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm
- 3) Saponin dianggap positif jika pada penambahan 1 tetes larutan asam klorida 2N apabila buih tidak hilang selama 10 menit

i. Skrining Fitokimia Steroid dan Triterpenoid

- 1) Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimaserasi dengan 20 ml n-heksana selama 2 jam, lalu disaring
- 2) Filtratnya diuapkan dalam cawan penguap
- 3) Pada sisa penguapan ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat
- 4) Amati warna yang timbul hingga perubahan warnanya
- 5) Steroid dan terpenoid dianggap positif apabila dengan timbulnya warna kecoklatan atau violet positif terpenoid dan timbulnya warna biru kehijauan positif steroid.

j. Skrining Fitokimia Fenolik

- 1) Masukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 10 ml air suling
- 2) Kocok perlahan dan biarkan memisah
- 3) Tambahkan pereaksi NaCl
- 4) Tambahkan 2-3 tetes pereaksi FeCl_3
- 5) Fenolik dianggap positif jika pada penambahan FeCl_3 terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam pekat.

k. Prosedur Kromatografi (Usman dan Muin, 2023)

- 1) Disiapkan alat dan bahan
- 2) Dilakukan pemotongan lempeng silika gel F_{254} dengan ukuran 7 cm x 3 cm, dengan batas-batas sebagai berikut : batas atas dengan tepi sepanjang 1 cm; batas bawah dengan tepi 1,5 cm; batas totalan dengan tepi kanan dan kiri 1,5 cm.
- 3) Dilakukan penjenuhan bejana kromatografi dengan eluen etil asetat : n-hexan (1:1)
- 4) Ditotolkan ekstrak kulit nanas sebanyak 2-10 μl menggunakan pipa kapiler pada lempeng silika gel F_{254} yang telah ditandai
- 5) Lempeng dimasukkan ke dalam bejana (yang sudah dijenuhkan dengan fase gerak), dengan posisi tegak dan bagian tepi bawah tercelup dalam fase gerak, tetapi totalan tidak sampai tenggelam
- 6) Bejana ditutup rapat dan biarkan fase gerak merambat hingga batas jarak rambat.

- 7) Dikeluarkan lempeng dan keringkan diudara, perhatikan bercak yang timbul dengan sinar tampak ultraviolet pada panjang gelombang 366 nm. Selanjutnya diukur dan dicatat jarak rambat setiap bercak yang timbul dan fase gerak dari titik penotolan sehingga diperoleh nilai RF.

Prosedur kromatografi (Putri dan Raharjo, 2019)

- 1) Siapkan alat dan bahan
- 2) Dilakukan pemotongan silica gel dengan ukuran 7 cm x 3 cm, dengan batas-batas sebagai berikut : batas atas dengan tepi sepanjang 1 cm; batas bawah dengan tepi 1,5 cm; batas totolan dengan tepi kanan dan kiri 1,5 cm.
- 3) Dilakukan penjujukan bejana kromatografi dengan eluen methanol : air (4:6)
- 4) Ditotolkan ekstrak kulit nanas sebanyak 2-10 μ l menggunakan pipa kapiler pada lempeng silika gel F₂₅₄ yang telah ditandai
- 5) Lempeng dimasukkan ke dalam bejana (yang sudah dijenuhkan dengan fase gerak), dengan posisi tegak dan bagian tepi bawah tercelup dalam fase gerak, tetapi totolan tidak sampai tenggelam
- 6) Bejana ditutup rapat dan biarkan fase gerak merambat hingga batas jarak rambat
- 7) Dikeluarkan lempeng dan keringkan diudara, perhatikan bercak yang timbul dengan sinar tampak ultraviolet pada panjang gelombang 366 nm. Selanjutnya diukur dan dicatat jarak rambat setiap bercak yang timbul dan fase gerak dari titik penotolan sehingga diperoleh nilai RF

E. Pengolahan Data dan Analisis Data

Data-data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel, hasil penelitian berupa hasil ekstraksi simplisia kulit buah nanas diskriming fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam kulit buah nanas, berupa Rf dan warna bercak noda pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ untuk mengetahui apakah ekstrak kulit buah nanas positif mengandung Flavonoid. Kemudian data diolah dengan cara deskriptif kualitatif.