

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan dari penelitian ini dilakukan menggunakan uji organoleptis simplisia dan ekstrak, skrining fitokimia, uji pH ekstrak dan uji flavonoid total ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, dimana ekstrak didapatkan dari proses maserasi bertingkat dengan pelarut yang kepolarannya semakin meningkat.

Penelitian ini dilakukan secara non eksperimental, data dikumpulkan melalui pengamatan hasil uji yang didapatkan dan disajikan dalam bentuk tabel. Hasil uji kemudian akan disajikan secara deskriptif.

B. Subjek Penelitian

Subjek dari penelitian ini adalah ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) asal Lampung Tengah yang diperoleh dari ekstraksi dengan maserasi bertingkat menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya. Sehingga, akan didapatkan tiga maserat kulit nanas, yaitu maserat yang didapat dari maserasi dengan pelarut n-heksana (non-polar), maserat yang didapat dari maserasi dengan pelarut etil asetat (semi polar) dan maserat yang didapat dari maserasi dengan etanol 70% (polar).

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi, Laboratorium Kimia Farmasi, Laboratorium Teknologi Sediaan Solida dan Ruang Instrumen Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjung Karang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada pada bulan Januari – Juni 2025.

D. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, talenan, wadah plastik, ayakan, *blender*, botol kaca, neraca analitik, toples kaca, derigen, *rotary evaporator*, *waterbath*, kaca arloji, spatula, batang pengaduk, gelas ukur 100 ml, pipet tetes, *beaker glass*, penangas air, tabung reaksi, corong *glass*, buret, labu ukur 100,0 ml, labu ukur 10,0 ml, tabung reaksi, vortex, kuvet, spektrofotometer UV-Vis.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.), n-heksana, etil asetat, etanol 70%, kertas saring, alumunium foil, label, serbuk Mg, HCl p, amil alkohol, gelatin 1%, NaCl, HCl 2 N, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, pereaksi bouchardat, eter, H₂SO₄ p, asetat anhidrat, alumunium klorida (AlCl₃), kalium asetat (CH₃COOK), kuersetin.

2. Prosedur Kerja

1. Pengidentifikasian tanaman

Pengidentifikasian buah nanas madu (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dengan cara membandingkan morfologinya dengan literatur dan pengidentifikasian di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.

2. Pembuatan simplisia kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

- a. Disiapkan alat dan bahan.
- b. Pengambilan bahan baku, yaitu kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) asal Lampung Tengah segar yang telah dipisahkan dengan daging buahnya.
- c. Dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dengan zat pengotor.
- d. Dilakukan pencucian kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel.

- e. Dilakukan perajangan terhadap kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) yang sudah dibersihkan.
- f. Dikeringkan kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) yang telah dirajang menggunakan cahaya matahari.
- g. Dilakukan sortasi kering untuk memisahkan simplisia kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) agar kotoran yang berkemungkinan terikut saat proses pengeringan bisa dihilangkan.
- h. Dihaluskan simplisia kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) menggunakan bantuan *blender* hingga terbentuk serbuk simplisia dengan ukuran yang lebih halus.
- i. Dilakukan pengayakan serbuk simplisia kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dengan ayakan *mesh* 40.
- j. Serbuk simplisia kulit nanas dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat.

3. Pengujian organoleptis pada simplisia kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

Pengujian organoleptis simplisia kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dilakukan dengan mengobservasi tekstur, aroma, dan warna dari masing-masing simplisia.

- 4. Pembuatan ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dengan metode maserasi bertingkat
 - a. Disiapkan alat dan bahan.
 - b. Ditimbang 215 gram simplisia kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) dengan neraca analitik.
 - c. Dimasukkan serbuk simplisia ke dalam toples.
 - d. Direndam serbuk simplisia menggunakan 860 ml n-heksana (1:4), kemudian di aduk hingga seluruh bagian simplisia terendam dengan baik, barulah toples di tutup rapat.
 - e. Didiamkan rendaman simplisia selama 2 x 24 jam dan setiap 6 jam sekali dilakukan pengadukan selama 1 menit secara berkala.
 - f. Setelah 2 x 24 jam, maserat di saring dengan kertas saring dan dimasukkan ke

dalam derigen yang telah diberi label untuk maserat dari pelarut n-heksana (non-polar) dan di tutup rapat.

- g. Dikeringkan residu selama tiga jam dengan cara diangin-anginkan hingga kering.
- h. Dimasukkan kembali residu ke dalam toples, yang kemudian direndam kembali dengan pelarut etil asetat sebanyak 860 ml (1:4) dan di aduk hingga seluruh bagian residu terendam dengan baik, lalu toples di tutup rapat.
- i. Didiamkan rendaman simplisia selama 2 x 24 jam dan setiap 6 jam sekali dilakukan pengadukan secara berkala.
- j. Setelah 2 x 24 jam, maserat di saring dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam derigen yang telah diberi label untuk maserat dari pelarut etil asetat (semi polar) dan di tutup rapat.
- k. Dikeringkan residu selama enam jam dengan cara diangin-anginkan hingga kering.
- l. Dimasukkan kembali residu ke dalam toples, yang kemudian direndam kembali dengan pelarut etanol 70% sebanyak 860 ml (1:4) dan di aduk hingga seluruh bagian residu terendam dengan baik, lalu toples di tutup rapat.
- m. Didiamkan rendaman simplisia selama 2 x 24 jam dan setiap 6 jam sekali dilakukan pengadukan secara berkala.
- n. Setelah 24 jam, maserat di saring dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam derigen yang telah diberi label untuk maserat dari pelarut etanol 70% (polar) dan di tutup rapat.
- o. Ketiga maserat yang di dapatkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan kecepatan 150 rpm, suhu 50 °C untuk maserat dari pelarut n-heksana dan etil asetat, serta suhu 70 °C untuk maserat dari pelarut etanol 70%.
- p. Setelah di dapatkan ekstrak yang telah dipekatkan, masing-masing ekstrak kental dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah ditimbang berat cawan kosongnya di neraca analitik dan dicatat.
- q. Diuapkan ekstrak kental di atas *waterbath* hingga didapatkan ekstrak pekat, kemudian ditimbang di neraca analitik dan dimasukkan ke dalam wadah.
- r. Dihitung jumlah rendemen ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.)

menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot Ekstrak (gr)}}{\text{Bobot Simplisia (gr)}} \times 100\%$$

5. Pengujian organoleptis pada ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

Pengujian organoleptis masing-masing ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dilakukan dengan mengobservasi konsistensi, aroma, dan warna dari masing-masing ekstrak pekat.

6. Pengujian skrining fitokimia pada ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

- a. Identifikasi Flavonoid

- 1) Disiapkan alat dan bahan.
- 2) Ditimbang masing-masing 100 mg ekstrak pekat kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) di neraca analitik menggunakan kaca arloji.
- 3) Dimasukkan ekstrak pekat ke dalam *beaker glass*, ditambahkan 1 ml pelarut dan *aquadest* panas, diaduk kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan.
- 4) Dipipet 0,5 ml ekstrak yang larut dalam *aquadest*, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diberi label, kemudian di tambahkan 10 mg serbuk Mg, 0,1 ml HCl p, dan 0,2 ml amil alkohol.
- 5) Di kocok campuran larutan, dan didiamkan agar terbentuk dua lapisan.
- 6) Diamati apabila ada warna kuning atau jingga, dan merah yang terbentuk pada lapisan amil alkohol. Jika terbentuk, maka positif flavonoid.

- b. Identifikasi Tanin

- 1) Disiapkan alat dan bahan.
- 2) Ditimbang masing-masing 20 mg ekstrak pekat kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) di neraca analitik menggunakan kaca arloji.
- 3) Dimasukkan ekstrak pekat ke dalam *beaker glass*, ditambahkan 2 ml pelarut dan *aquadest*, diaduk kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan.

- 4) Dipipet 1 ml ekstrak yang larut dalam *aquadest* ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml gelatin 1% yang mengandung NaCl.
- 5) Diamati endapan putih yang terbentuk. Jika terbentuk, maka dinyatakan positif tanin.

c. Identifikasi Alkaloid

- 1) Disiapkan alat dan bahan.
- 2) Ditimbang masing-masing 200 mg ekstrak pekat kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) di neraca analitik menggunakan kaca arloji.
- 3) Dimasukkan ekstrak pekat ke dalam *beaker glass*, ditambahkan 3,6 ml pelarut beserta *aquadest*, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit sembari diaduk.
- 4) Didinginkan larutan hingga terbentuk dua lapisan dan dipipet bagian ekstrak yang larut dalam *aquadest* untuk disaring, kemudian ditambahkan 0,4 ml HCl 2 N.
- 5) Dipipet filtrat masing-masing 0,5 ml dan dimasukan ke dalam tiga tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahkan pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Bouchardat.
- 6) Diamati endapan yang terbentuk. Hasil positif dari uji ini dinyatakan dengan terbentuknya pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih, pereaksi Bouchardat menghasilkan endapan coklat-hitam, dan pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan merah bata.

d. Identifikasi Steroid atau Terpenoid

- 1) Disiapkan alat dan bahan.
- 2) Ditimbang masing-masing 100 mg ekstrak pekat kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) di neraca analitik menggunakan cawan porselen
- 3) Ditambahkan 1 ml etanol, 0,2 ml eter, dan diuapkan hingga kering.
- 4) Ekstrak yang telah kering ditambahkan 1 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 tetes asetat anhidrat.
- 5) Diamati perubahan warna merah-ungu atau hijau yang terjadi. Jika terbentuk, maka dinyatakan positif steroid atau terpenoid.

e. Identifikasi Saponin

- 1) Disiapkan alat dan bahan.
- 2) Ditimbang masing-masing seujung spatula ekstrak pekat kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) di neraca analitik menggunakan kaca arloji.
- 3) Dimasukkan ekstrak pekat ke dalam *beaker glass*, ditambahkan sedikit pelarut dan 10 ml *aquadest* panas, diaduk dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan.
- 4) Dimasukkan bagian ekstrak yang larut dalam *aquadest* ke dalam tabung reaksi, dikocok kuat selama 10 detik, lalu ditambahkan 1 tetes HCl 2 N.
- 5) Diamati ada atau tidaknya buih setelah penambahan HCl 2 N. Jika buih tetap, maka dinyatakan positif saponin.

7. Uji pH ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

- 1) Diambil 50 mg ekstrak, dimasukkan ke dalam *beaker glass*.
- 2) Ditambahkan dengan 10 ml pelarut dan *aquadest*, kemudian diambil bagian yang larut dalam *aquadest* saja.
- 3) Dimasukkan pH meter ke dalam ekstrak yang telah diencerkan.
- 4) Ditunggu beberapa detik, kemudian diamati angka yang muncul.

8. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

a. Pembuatan larutan

- 1) Pembuatan larutan Alumunium Klorida (AlCl_3) 10%
 - a) Disiapkan alat dan bahan.
 - b) Ditimbang 1000 mg atau 1 gram AlCl_3 di neraca analitik menggunakan kaca arloji, dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan 5 ml etanol 70%, diaduk hingga homogen.
 - c) Dimasukkan larutan Alumunium Klorida (AlCl_3) ke dalam labu ukur 10,0 ml dan ditambahkan etanol 70% hingga tanda batas, dikocok larutan hingga homogen.
 - d) Dimasukkan larutan ke dalam botol kaca yang telah diberi label.

- 2) Pembuatan larutan Kalium Asetat (CH_3COOK) 1 M
 - a) Disiapkan alat dan bahan.
 - b) Ditimbang 981,4 mg atau 0,9814 gram kalium asetat (CH_3COOK) menggunakan kaca arloji, dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan 5 ml etanol 70%, diaduk hingga homogen.
 - c) Dimasukkan larutan kalium asetat (CH_3COOK) ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan etanol 70% hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.
 - d) Dimasukkan larutan ke dalam botol kaca yang telah diberi label.

- b. Penetapan kadar flavonoid total
 - 1) Pembuatan larutan induk kuersetin 100 ppm
 - a) Disiapkan alat dan bahan.
 - b) Ditimbang kuersetin di neraca analitik sebanyak 10 mg menggunakan kaca arloji, dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan 5 ml etanol 70%, diaduk hingga homogen.
 - c) Dimasukkan larutan kuersetin ke dalam labu ukur 100,0 ml, ditambahkan etanol 70% hingga tanda batas, kemudian dikocok hingga homogen.
 - d) Dimasukkan larutan ke dalam botol kaca yang telah diberi label.

 - 2) Pembuatan larutan seri standar kuersetin 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm
 - a) Diambil larutan induk menggunakan buret sebanyak 0,2 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambahkan etanol 70% hingga tanda batas untuk mendapatkan larutan seri standar 2 ppm. Dimasukkan larutan ke dalam botol kaca yang telah diberi label.
 - b) Diulangi tahapan tersebut untuk membuat larutan seri standar 4, 6, 8, dan 10 ppm dengan mengambil larutan induk sebanyak 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, dan 1 ml.

 - 3) Pembuatan larutan blanko
 - a) Diambil 4 ml etanol 70% menggunakan buret, dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml.
 - b) Ditambahkan 0,2 ml kalium asetat (CH_3COOK) 1 M dan 0,2 ml aluminium

klorida (AlCl_3) menggunakan buret, dicampurkan ke dalam labu ukur 10,0 ml.

- c) Ditambahkan *aquadest* ke dalam labu ukur 10,0 ml hingga tanda batas, dikocok hingga homogen dan dimasukkan ke dalam botol yang diberi label.

- 4) Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks)
 - a) Diambil etanol 70% sebanyak 1,5 ml larutan standar kuersetin 6 ppm sebanyak 0,5 ml menggunakan pipet ukur, dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
 - b) Ditambahkan larutan standar 6 ppm sebanyak 0,5 ml, alumunium klorida (AlCl_3) sebanyak 0,1 ml, dan kalium asetat (CH_3COOK) 1 M sebanyak 0,1 ml ke dalam tabung reaksi menggunakan buret.
 - c) Dimasukkan *aquadest* 2,8 ml ke dalam tabung reaksi menggunakan pipet ukur.
 - d) Dikocok larutan hingga homogen menggunakan vortex dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-500 nm.

- 5) Pembuatan kurva kalibrasi
 - a) Diambil larutan standar kuersetin 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm masing-masing sebanyak 0,5 ml menggunakan buret ke dalam tabung reaksi.
 - b) Ditambahkan etanol 70% sebanyak 1,5 ml menggunakan pipet ukur.
 - c) Ditambahkan alumunium klorida (AlCl_3) sebanyak 0,1 ml, kalium asetat (CH_3COOK) 1 M sebanyak 0,1 ml menggunakan buret.
 - d) Ditambahkan *aquadest* sebanyak 2,8 ml menggunakan pipet ukur.
 - e) Dikocok larutan hingga homogen menggunakan vortex, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar.
 - f) Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum.

- 6) Pembuatan larutan ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) 20.000 ppm
 - a) Ditimbang 0,2 gram ekstrak di neraca analitik menggunakan kaca arloji.

- b) Dimasukkan ke dalam *beaker glass*, ditambahkan pelarut yang sesuai untuk melarutkan ekstrak n-heksana dan etil asetat, ditambahkan sedikit etanol 70% dan diambil bagian yang larut dalam etanol 70%.
 - c) Ditambahkan 5 ml etanol 70% yang diukur menggunakan gelas ukur 10 ml, diaduk hingga homogen.
 - d) Dimasukkan larutan ke dalam labu ukur 10,0 ml.
 - e) Ditambahkan etanol 70% ke dalam labu ukur 10,0 ml hingga tanda batas, dikocok hingga homogen dan dimasukkan ke dalam botol kaca yang telah diberi label.
- 7) Pengenceran larutan ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) menjadi 100 ppm
- a) Diambil larutan ekstrak 20.000 ppm sebanyak 0,5 ml, dimasukkan ke dalam *beaker glass*, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml.
 - b) Ditambahkan dengan etanol 70% hingga mencapai tanda batas, kemudian dikocok hingga homogen dan dimasukkan ke dalam botol kaca yang telah diberi label.
- 8) Penetapan kadar flavonoid total ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.)
- a) Diambil sebanyak 0,5 ml larutan ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) 100 ppm menggunakan buret ke dalam tabung reaksi.
 - b) Ditambahkan etanol 70% sebanyak 1,5 ml menggunakan pipet ukur ke dalam tabung reaksi
 - c) Ditambahkan aluminium klorida (AlCl_3) 10% sebanyak 0,1 ml dan kalium asetat (CH_3COOK) 1 M sebanyak 0,1 ml menggunakan buret, kemudian dicampurkan ke dalam tabung reaksi.
 - d) Dimasukkan 2,8 ml *aquadest* menggunakan pipet ukur dan dicampurkan ke dalam tabung reaksi.
 - e) Dikocok larutan hingga homogen menggunakan vortex, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit.
 - f) Diukur absorbansi larutan ekstrak menggunakan spektrofotometer Uv-Vis,

dengan panjang gelombang maksimum.

- g) Dihitung kadar flavonoid total menggunakan rumus:

$$\text{Kesetaraan kuersetin} = y = ax + b$$

$$\text{Kandungan flavonoid} = \frac{C \times V \times Fp}{M}$$

Keterangan :

C = Kesetaraan Kuersetin (mg/L)

V = Volume total ekstrak (ml)

Fp = Faktor pengenceran

M = berat sampel (mg)

E. Pengolahan Data

Data didapatkan melalui persamaan regresi linear yang berasal dari kurva kalibrasi kuersetin, menggunakan rumus $y = ax + b$, sehingga hasil dari perhitungan tersebut adalah kesetaraan kuersetin. Nilai X yang didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam rumus favonoid total, dan hasilnya merupakan persentase serta kadar total flavonoid berdasarkan Quersetin Ekuivalen yang terkandung dalam ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.).