

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk menguji aktifitas antioksidan dari hasil fermentasi ekstrak etanol daun terubuk fermentasi fraksi n-heksana dan etil asetat dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan karakterisasi ekstrak etanol dengan metode LC-HRMS. Pengukuran hasil pengujian aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai IC_{50} . Kemudian dilakukan pengujian LC-HRMS untuk menganalisis kadar dan identifikasi senyawa yang ada pada fermentasi daun terubuk.

3.2 Sampel

Sampel penelitian merupakan daun terubuk yang diambil di Kecamatan Tegalwaru Loji Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat. Dilakukan pemilihan bahan secara segar (basah) yang dilanjutkan dengan pencucian daun di bawah air mengalir. Selanjutnya, daun terubuk dikeringkan secara alami, sebelum pengeringan dipotong kecil-kecil terlebih dahulu, kemudian dikeringkan selama 2 hari, dan dihaluskan.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dari bulan Januari hingga Juni 2025. Pengujian LC-HRMS dilakukan pada Laboratorium Karakterisasi Lanjut Kimia Maju - BRIN (Badan Riset dan Inovasi Nasional), Gedung 452 Kawasan Sains dan Teknologi BJ Habibie, Tangerang Selatan, Banten.

3.4 Bahan dan Alat

3.4.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya, simplisia daun terubuk (*Saccharum edule* (Hask)), etanol 96%, aquadest, n-heksana, etil asetat, DPPH (2,2-diphenyl-1-

picrylhydrazyl), Vitamin C, pereaksi dragendrof, pereaksi mayer, Liberman-Bouchard, HCl 2N, NaCl, FeCl₃ 1%, etanol p.a.

3.4.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu, labu ukur (*Pyrex*), neraca analitik digital, blender, maserator, rotary evaporator, mikro pipet (JOANLAB), kuvet, gelas ukur (Iwaki), corong (*Pyrex*), pipet tetes, cawang penguap, vial, (Spektrofotometer UV-vis (*Thermo Scientific Evolution*), LC-HRMS, spatel logam, batang pengaduk, rak tabung, tabung reaksi (Iwaki), *water bath*.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Definisi Operasional Variabel

Berikut merupakan definisi variabel operasional yang terdapat pada penelitian ini sebagai berikut :

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Rasio
Variabel Bebas				
Ekstrak Etanol Daun Terubuk	Ekstrak etanol daun terubuk adalah ekstrak kental yang terbuat dari daun terubuk yang sudah dikeringkan dan diekstraksi dengan etanol 96% untuk memperoleh rendemen ekstrak	Observasi	Nominal	%

Variabel Terikat					
Skrining Fitokimia	Ekstrak yang sudah dimaserasi dan didapatkan ekstrak kental di uji dengan reagen pendeteksi golongan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, dll. Kemudian dilihat perubahan warna dan endapan yang terjadi	Observasi	Nominal	Tidak berwarna dan tidak ada endapan – berwarna dan ada endapan	
Uji Antioksidan	Memipet dari masing-masing larutan uji ekstrak, kemudian ditambahkan dengan larutan DPPH, selanjutnya dilakukan inkubasi dan serapan diukur pada panjang gelombang maksimum.	Spektrofotometer Uv-Vis	Rasio	% (persen)	
LC-HRMS	Hasil ekstrak etanol fermentasi daun terubuk dimasukkan ke dalam sistem LC, akan dialirkan dengan fase gerak, selanjutnya deteksi menggunakan spektrofotometri massa	Kromatografi Cair / <i>Liquid Chromatography</i> (LC) dan Spektrofotometri Massa (MS).	Nominal	mendeteksi keberadaan berbagai senyawa dalam sampel.	

3.5.2 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol dan fraksi daun terubuk (*Saccharum edule* (Hask)).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu standarisasi simplisia, skrinning fitokimia, Nilai IC₅₀ hasil uji dari aktivitas antioksidan ekstrak daun terubuk (*Saccharum edule* (Hask)) dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan juga LC-HRMS

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi

Determinasi tanaman uji merupakan langkah krusial untuk memverifikasi identitas spesies yang akan digunakan dalam penelitian. Proses ini dilaksanakan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Padjadjaran.

3.6.2 Penyiapan Sampel

Daun terubuk segar dipilah untuk memisahkan daun yang rusak. Setelah dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, daun terubuk dikeringkan secara alami di bawah sinar matahari, namun dilindungi dengan kain tipis agar terhindar dari sinar matahari langsung. Daun kering kemudian dipilah kembali, ditimbang simplisia dan disimpan di dalam wadah yang kedap udara.

3.6.3 Fermentasi

1. Preparasi Daun Terubuk

Daun terubuk yang sudah kering dengan cara diangin-anginkan diblender hingga lumayan halus.

2. Pembuatan Media Agar

Larutkan 0,5 gram media *Potato Dextrose Agar* (PDA) ke dalam air suling (akuades), homogenkan, sterilisasi menggunakan autoklaf, dan tuangkan ke dalam cawan petri tunggu hingga mengeras.

3. Peremajaan *Aspergillus oryzae*

Jamur *Aspergillus oryzae* diambil dengan jarum ose steril, kemudian diinokulasi ke dalam medium *Potato Dextrose Agar* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, dibuat suspensi spora jamur yang tumbuh dibandingkan dengan menggunakan McFarland standar turbiditas 0,5.

4. Fermentasi Daun Terubuk

Sebanyak 200 gram simplisia daun terubuk ditambahkan 800 mL aquaset (1:4 b/v). Suspensi spora diinokulasi sebanyak 1 % yang didapatkan dari peremajaan *Aspergillus oryzae* yang telah dibandingkan dengan McFarland standar turbiditas 0,5 dan diinkubasi dengan waktu 72 jam (Putri *et al.*, 2023).

3.6.4 Ekstraksi

Setelah masa inkubasi, hasil filtrat hasil fermentasi daun terubuk disaring dan daun terubuk dikeringkan kembali selama 2 hari, kemudian direndam dalam etanol 96% selama 24 jam dengan perbandingan 1:10, sambil sesekali diaduk, lalu ekstrak disaring menggunakan kertas saring. Dilakukan remaserasi pada sampel sebanyak 4 kali pengulangan. Semua hasil ekstraksi dengan pelarut etanol digabungkan dan diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental, kemudian rendemen ekstrak

kental pelarut etanol dihitung. Ekstraksi ini bertujuan untuk menarik senyawa-senyawa aktif dari kultur, termasuk senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh jamur.

Rendemen ekstrak yang didapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Berat simplisia yang digunakan (g)}} \times 100\%$$

3.6.5 Skrining Fitokimia

1. Uji Alkaloid

Pengujian dilakukan dengan metode Mayer dan Dragendorff. Sebanyak 3 mg sampel dicampur dengan HCl 2 M sebanyak 3 tetes HCl 2 M, kemudian Mayer dan salah satu diberi pereaksi Dragendorff. Jika alkaloid terdeteksi dalam sampel, endapan putih dan jingga akan terbentuk pada filtrat yang ditambahkan pereaksi Mayer dan Dragendorff (Sabdoningrum *et al.*, 2021).

2. Uji Flavonoid

Sedikit Mg dimasukkan ke dalam 5 mg ekstrak dan dikocok dengan 1 mL HCl. Warna merah muda hingga merah tua menunjukkan flavonoid (Kalauni *et al.*, 2024).

3. Uji Tanin

Ekstrak sebanyak 3 mg ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Filtrat yang berwarna hijau berubah menjadi hijau tua atau biru kehitaman, menunjukkan adanya tanin (Bajrami *et al.*, 2023)

4. Uji Saponin

Ekstrak dilarutkan dengan air suling yang dipanaskan selama 15 menit, kemudian diguncang dengan kuat selama 10 hingga 15 detik, bila terbentuk buih yang stabil selama sekitar 10 menit dan tidak menghilang, maka ditambahkan sedikit HCl

2N. Jika buih tetap ada, sampel dinyatakan positif mengandung saponin (Aulia et al., 2023)

5. Uji Terpenoid dan Steroid

Uji terpenoid menggunakan metode Lieberman-Bouchard. Sebanyak 0,5 gram ekstrak diletakkan pada cawan penguap, kemudian ditambahkan reagen Lieberman- Bouchard dan diaduk. Reaksi triterpenoid dengan reagen terpenoid menghasilkan warna merah-ungu sedangkan steroid menghasilkan warna hijau-biru (Sabdoningrum *et al.*, 2021).

6. Fenolik

Identifikasi senyawa fenolik dilakukan dengan mereaksikan sampel menggunakan larutan FeCl_3 1%. Reaksi positif ditunjukkan oleh perubahan warna menjadi hijau, ungu, biru, atau hitam (Ningsih *et al.*, 2020).

3.6.6 Fraksinasi

Ekstrak etanolik (5 g) dilarutkan dalam 100 mL air-etanol (8:2) dan diekstraksi dengan 300 mL n-heksana (1:3) sampai terekstraksi seluruhnya untuk mendapatkan n-heksana dan fraksi air. Fraksi air tersebut diekstraksi kembali dengan 300 mL etil asetat (1:3) sampai terekstraksi sempurna untuk mendapatkan fraksi air dan fraksi etil asetat (Faramayuda *et al.*, 2022).

3.6.7 LC-HRMS

Analisis profil metabolit ekstrak etanol daun terubuk (*Saccharum edule* (Hask)) dilakukan menggunakan instrumen Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS, Thermo Scientific Exploris 120). Preparasi sampel dimulai dengan melarutkan ± 2 mg ekstrak kering ke dalam 2 mL pelarut (metanol, asetonitril, atau air sesuai kelarutan). Larutan kemudian divortex dan disonikasi selama 15–30 menit hingga

homogen, lalu disaring menggunakan membran filter 0,2 μm untuk memperoleh filtrat jernih. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga mencapai konsentrasi 50 ppm menggunakan pelarut yang sama, kemudian ditambahkan 0,1% asam format dalam air sebelum injeksi.

Instrumen LC-HRMS dijalankan dengan kondisi dimana, sistem LC dihubungkan dengan kolom ZORBAX Eclipse Plus C18 ($2,1 \times 100 \text{ mm}$; 1,8 μm) sebagai fase diam. Fase gerak terdiri atas campuran metanol/asetonitril dan air yang mengandung 0,1% asam format. Sampel dimasukkan ke dalam vial dan ditempatkan pada autosampler, kemudian diinjeksi secara otomatis ke dalam sistem kromatografi cair. Pemisahan dilakukan berdasarkan polaritas senyawa, dilanjutkan dengan deteksi oleh spektrometer massa resolusi tinggi dengan mode full scan pada rentang m/z 50–750.

Data kromatogram yang diperoleh diolah menggunakan perangkat lunak Compound Discoverer 7.0. Proses pengolahan meliputi pemilihan kromatogram, identifikasi senyawa, serta analisis spektrum massa. Hasil analisis dilaporkan dalam bentuk profil senyawa metabolit yang terdeteksi pada sampel ekstrak. Data yang diperoleh dianalisis pada mode full-scan untuk menentukan massa akurat, kemudian dilanjutkan dengan analisis fragmen menggunakan ddMS².

Data hasil analisis dikoreksi terhadap blanko pelarut untuk menghilangkan kemungkinan kontaminasi atau sinyal latar. Selanjutnya, data difilter dengan perangkat lunak menggunakan ambang intensitas minimal $5,0 \times 10^3$ agar hanya fitur bermakna yang dipertahankan. Identifikasi senyawa dilakukan secara kualitatif berdasarkan massa akurat, pola isotopik, serta fragmen hasil spektrum MS/MS (BRIN, 2025).

3.6.8 Uji Antioksidan dengan Metode DPPH

1. Pembuatan larutan DPPH

DPPH sebanyak 2 mg dilarutkan dalam etanol pro-analitik hingga volume 50 mL dalam labu ukur untuk memperoleh konsentrasi 40 ppm. Larutan DPPH disimpan pada suhu rendah dan dilindungi dari paparan cahaya.

2. Pengukuran Vitamin C

Larutan stok dibuat dengan melarutkan 2,5 mg vitamin C dalam etanol pro-analisis dalam labu ukur 50 mL dan menambah volume sampai tanda batas. Larutan pembanding dibuat dengan konsentrasi (2, 4, 6, 8, dan 10) ppm. Setiap konsentrasi dilarutkan dalam 10 mililiter etanol p.a hingga batas tanda. Ambil 2 mililiter dari setiap larutan uji dan masukkan ke dalam botol coklat, lalu tambahkan 2 mililiter larutan DPPH 50 ppm, dan kocok hingga tercampur merata. Setelah itu, inkubasi larutan pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm (Riskianto *et al.*, 2022).

3. Pengukuran Fraksi Daun Terubuk

Untuk mengukur fraksi etil asetat dan n-heksana dari hasil ECC ekstrak etanol 96% fermentasi daun terubuk, larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 10 mg ekstrak hasil fraksi dalam etanol pro-analisis (p.a) dalam labu ukur 10 mL. Kemudian dibuat pengenceran bertahap dengan konsentrasi 10, 20, 40, 80, dan 100 ppm. Setiap konsentrasi ditambahkan 2 mL larutan DPPH 40 ppm, kemudian dihomogenkan dan diinkubasi dalam gelap selama 30 menit. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Setelah itu, dilakukan penghitungan IC_{50} dari sampel dengan mengukur nilai

absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum DPPH (Erikania *et al.*, 2023).

4. Penentuan IC₅₀

Konsentrasi dalam sampel dan persen penghambatan dibuat pada sumbu x dan y dalam persamaan regresi linier. Perhitungan IC₅₀ dilakukan dengan cara mengonversi absorbansi sampel menjadi bentuk persen antioksidan. Nilai IC₅₀ bisa diperoleh dengan memasukkan nilai IC₅₀ sebagai y dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari hubungan x = kadar, dan y = % antioksidan. Persentasi penghambatan terhadap radikal DPPH dari masing – masing konsentrasi sampel dapat dihitung dengan persamaan berikut (Riskianto *et al.*, 2022):

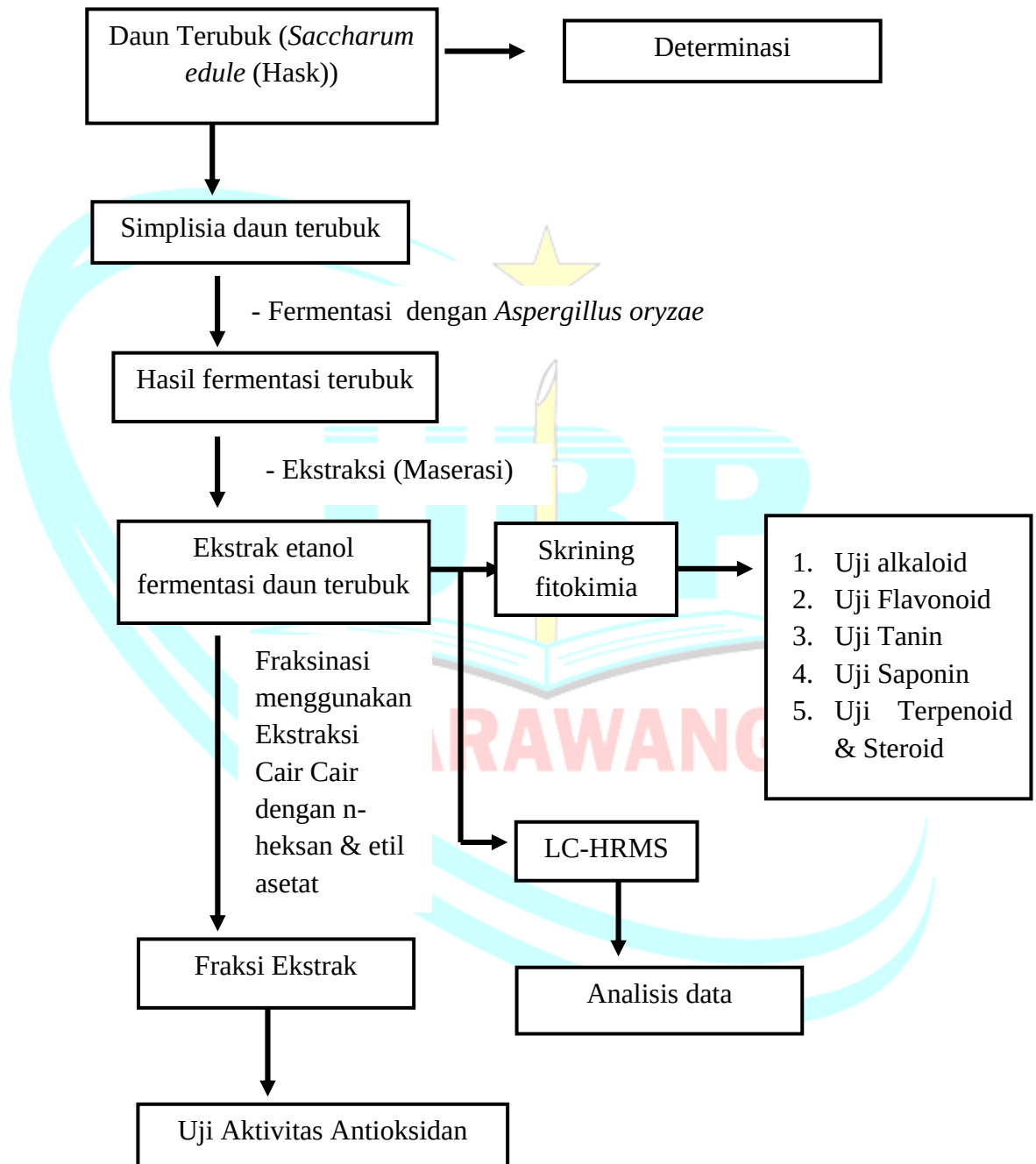
$$\%Inhibisi = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

3.7 Analisis Data

Proses analisis data dilakukan secara deskriptif melalui perhitungan nilai rata-rata, kemudian hasilnya disajikan dalam bentuk tabel dan grafik untuk menunjukkan aktivitas antioksidan fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dari hasil fermentasi daun terubuk (*Saccharum edule* (Hask)).

3.8 Diagram Alir Penelitian

Berikut merupakan alur kegiatan yang akan dilakukan :



Gambar 1. Diagram alir penelitian