

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dengan pendekatan eksperimental yang menggunakan desain deskriptif-komparatif. Tujuannya adalah untuk membandingkan aktivitas antioksidan antara ekstrak etanol dan fraksi air daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis*) melalui metode DPPH, serta mengidentifikasi senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak etanol menggunakan analisis LC-MS. Seluruh kegiatan penelitian dilaksanakan di laboratorium dan mencakup beberapa tahap, yaitu skrining fitokimia guna mengidentifikasi golongan metabolit sekunder, pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi air dengan metode DPPH, serta analisis senyawa bioaktif dalam ekstrak etanol menggunakan instrumen LC-MS.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di dua lokasi, yaitu di Laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang dan di Tropical Disease Diagnostic Center (TDC), Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian dilaksanakan dalam rentang waktu bulan Februari hingga Juli tahun 2025.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum.) yang tumbuh di wilayah Puncak Loji, Kota Karawang. Sampel penelitian diambil berupa daun terubuk segar yang kemudian dikeringkan. Pemilihan sampel dilakukan dengan mempertimbangkan variasi karakteristik seperti ukuran, tingkat kematangan, dan kondisi lingkungan tempat tumbuh untuk memastikan hasil penelitian yang representatif.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebasnya adalah jenis ekstrak yang digunakan, yaitu ekstrak etanol daun terubuk dan fraksi air hasil ekstraksi daun terubuk.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikatnya adalah karakteristik senyawa bioaktif yang teridentifikasi dalam ekstrak daun terubuk, skrining fitokimia, dan aktivitas antioksidan yang diukur melalui nilai IC_{50} .

3.5 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini adalah tabel definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini:

Tabel 3. 1 Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Rasio
Variabel Bebas				
Jenis Ekstrak	Jenis ekstrak yang digunakan, yaitu ekstrak etanol daun terubuk dan fraksi air daun terubuk.	Observasi	Nominal	
Variabel Terikat				
Karakterisasi Senyawa Bioaktif	Karakteristik senyawa bioaktif yang teridentifikasi dalam ekstrak daun terubuk.	LC-MS untuk identifikasi senyawa bioaktif.	Nominal	
Skrining fitokimia	metode kualitatif untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, kuinon, dan steroid dalam ekstrak tanaman	melalui reaksi kimia spesifik menggunakan pereaksi tertentu.	Nominal	1. Positif 2. Negatif
Uji Aktivitas Antioksidan	Aktivitas antioksidan pada ekstrak daun terubuk diukur	Spektrofotometri UV-VIS	Rasio	ppm (Part Per Million)

berdasarkan kemampuan ekstrak untuk menangkap radikal bebas yang direpresentasikan oleh nilai IC_{50} (konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat 50% radikal bebas).

3.6 Bahan dan Alat

3.6.1 Bahan

Bahan yang dipakai pada penelitian ini yaitu Ekstraksi maserasi etanol 96% Pelepah Daun Terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum.), Etanol 96% (PT. Bratacho), Aquadest (PT. Bratacho), N-Heksana (PT. Bratacho), Aethylacetat (PT. Bratacho), DPPH Sigma Aldrich (CV. Sentra Tekno Sains Indonesia), Etanol P.a (Merck), vitamin C (Nitra Kimia), asetonitril, Kloroform, HCl, KOH, $FeCl_3$, CH_3COOH , H_2SO_4 , NaOH, Dragendrof, Mayer, Magnesium, Lieberman dan $AlCl_3$.

3.6.2 Alat

Peralatan yang dipakai yaitu timbangan analitik (*adam scientific*), glass beaker (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), cawan porselen (Pyrex), labu ukur (Pyrex), Corong pisah (Pyrex), corong glass (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), vial, water bath, kain hitam, botol coklat, blender, batang pengaduk, tabung reaksi, *water bath* (memmer), *rotary evaporator* (eyla osb-2100-ce), instrumen LC-MS, spektrofotometer UV-Vis (VWR UV-1600PC), mikropipet, toples kaca kedap udara, batang pengaduk, spatula, oven, desikator, pipet tetes, hot plate, kertas saring, dan kuvet.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Determinasi

Determinasi Tanaman Terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum.) dilakukan dengan cara membandingkan atau mempersamakan ciri-ciri tumbuhan yang akan diteliti dengan tumbuhan lain yang sudah dikenal identitasnya (Muresu *et al.*, 2022). Dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI Kampus UI Depok.

3.7.2 Ekstraksi dan Fraksinasi

Daun terubuk dicuci bersih dan dipotong-potong dengan ukuran 0,3-0,5 cm, kemudian dikeringkan selama 3 hari, selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 60 mesh. Daun terubuk diekstrak menggunakan metode maserasi dengan cara bubuk daun terubuk ditimbang 300 gram dan ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10, selanjutnya dimaserasi selama 72 jam pada suhu kamar, setelah melakukan maserasi pada waktu yang ditentukan larutan disaring menggunakan kertas Whatman no 1, kemudian filtrat yang diperoleh diuapkan dengan rotary vakum evaporator, maka diperoleh ekstrak daun terubuk (Widodo *et al.*, 2021).

Fraksinasi ekstrak dilakukan secara partisi dengan menggunakan campuran dua pelarut yang memiliki kepolaran yang berbeda. Campuran pelarut pertama adalah campuran n-heksana : air dan yang kedua adalah campuran etil asetat: air. Pertama. Ekstak etanol dengan berat tertentu dilarutkan dalam air dengan volume tertentu sehingga ekstrak terlarut semuanya, kemudian n-heksana dengan volume tertentu ditambahkan untuk melarutkan ekstrak yang terlarut dalam pelarut non polar. Campuran tersebut dimasukkan kedalam corong pisah dan dikocok kuat-kuat hingga diperoleh lapisan air dan lapisan n-heksana, kedua lapisan kemudian dipisahkan. Kedalam lapisan air, selanjutnya ditambahkan etil asetat dan

campuran tersebut dikocok kuat-kuat sehingga diperoleh lapisan air dan lapisan etil asetat, dan kedua lapisan tersebut dipisahkan. Lapisan n-heksana, lapisan air dan lapisan etil asetat kemudian diuapkan dalam rotary evaporator hingga diperoleh fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air (Najihudin *et al.*, 2017).

3.7.3 Skrining Fitokimia

Prosedur skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi berbagai senyawa bioaktif dalam ekstrak, yang meliputi beberapa langkah analisis kualitatif sebagai berikut:

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 5 mL filtrat ditambahkan 5 mL HCl, larutan dibagi menjadi dua bagian masing-masing ditambahkan dengan pereaksi Mayer dan Dragendorf. Adanya kabut putih atau endapan putih saat ditambahkan pereaksi Mayer menandakan sample positif alkaloid. Sedangkan, adanya endapan merah bata saat penambahan pereaksi Dragendorf menandakan bahwa sample positif alkaloid (Fadhly *et al.*, 2015).

2. Uji Flavonoid

Tambahkan sekitar 1 mililiter ekstrak dan taburi bubuk magnesium secukupnya bersama dengan 10 tetes asam klorida pekat. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan adanya warna merah kehitaman, kuning atau jingga (Aulia *et al.*, 2023).

3. Uji Fenolik

Tuang 1 milliliter ekstrak pada tabung reaksi dan masukkan 10 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terciptanya warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau (Aulia *et al.*, 2023).

4. Uji Saponin

Ekstrak dilarutkan dalam aquades yg dididihkan kurun waktu 15 menit, Selanjutnya digoyangkan dengan kuat kurun waktu 15 atau 10 detik, jika terbentuk buih yang stabil kurun waktu sekitar

10 menit dan tidak hilang sejumlah kecil HCl 2N dimasukkan, maka sampel positif mengandung saponin (Aulia *et al.*, 2023).

5. Uji Tanin

Sebanyak 3 mililiter ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambah 5 tetes gelatin 1%, adanya rona kuning jernih, endapan putih menunjukkan positif tanin (Aulia *et al.*, 2023).

6. Uji Kuinon

Ekstrak serbuk pelepah daun ditimbang 1 gram dan ditambahkan 20 mL lalu disaring, ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian digabungkan dengan larutan KOH 5% . Jika rona kuning hingga merah menunjukkan hasil yang didapatkan positif (Aulia *et al.*, 2023).

7. Uji Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid

Sampel dilarutkan dengan eter digerus, disaring, lalu diuapkan sampai kering, lalu teteskan vanilin 10% dalam H₂SO₄ pekat. Hasil positif menunjukkan adanya terbentuknya warna–warna (Aulia *et al.*, 2023).

8. Uji Triterpenoid dan Steroid

Sampel dilarutkan dengan eter lalu digerus, disaring, lalu diuapkan sampai kering, kemudian ditetaskan dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Jika hasil positif mengandung triterpenoid ditunjukkan dengan adanya warna ungu, dan golongan steroid ditunjukkan dengan warna biru-kehijauan (Aulia *et al.*, 2023).

3.7.4 LC-MS

Sampel yang akan dianalisis terlebih dahulu dikeringkan dan ditimbang sebanyak 0,0010 gram menggunakan tabung Eppendorf. Setelah itu, sampel dilarutkan ke dalam 1 mL metanol, kemudian divortex hingga larut secara homogen. Larutan sampel dimasukkan ke dalam vial sampel untuk kemudian dianalisis menggunakan instrumen LC-MS Agilent 6530 QTOF LC/MS. Pemilahan senyawa dalam kromatografi cair dilakukan menggunakan kolom POROSHELL 120

EC-C18 (3.0 × 50 mm, 2.7 μm) dengan fase gerak berupa pelarut A (air) dan pelarut B (asetonitril/ACN). Sistem pemisahan berjalan secara gradien, dimulai pada menit ke-0 dengan komposisi 95% air: 5% ACN, kemudian berubah bertahap hingga menit ke-15 menjadi 5% air: 95% ACN. Laju alir (flow rate) yang digunakan adalah 0,4 mL/menit dengan volume injeksi sampel sebanyak 10 μL. Instrumen spektrometer massa dioperasikan dalam mode ionisasi positif, dengan Collision Energy disetel pada 0 eV agar dapat menangkap ion molekul utuh tanpa fragmentasi awal. Aliran gas pengering (dry gas) diatur sebesar 8 L/menit. dengan temperatur 300°C untuk membantu penguapan pelarut dan meningkatkan efisiensi ionisasi (Pathiassana *et al.*, 2020)

3.7.5 Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Pengujian metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) digunakan untuk melakukan pemeriksaan ini. Uji antioksidan meliputi pembuatan larutan ekstrak etanol daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *Edule* (Hassk) K. Schum), fraksi air daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *Edule* (Hassk) K. Schum), penentuan panjang gelombang maksimum, pembuatan larutan blanko, pembuatan larutan pembanding vitamin C, serta pembuatan larutan sampel untuk masing-masing ekstrak dan fraksinya. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan mengukur kemampuan ekstrak dan fraksi air daun terubuk dalam meredam radikal bebas DPPH melalui pengamatan perubahan absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

1. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat pada konsentrasi 50 ppm dengan cara menimbang 2,5 mg serbuk DPPH, kemudian menambahkan etanol hingga menjadi 50 ml atau mencapai batas batas (Siregar *et al.*, 2020)

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Mengambil 4 mililiter larutan DPPH ke dalam kuvet kemudian digunakan spektroskopi UV-Vis untuk mengukur panjang gelombang maksimum DPPH pada 200–800 nm (Siregar *et al.*, 2020)

3. Pembuatan Larutan Vitamin C

Vitamin C sebanyak 100 ppm ditimbang 2,5 milligram (mg), kemudian dilarutkan dalam metanol p.a 25 mililiter, dituangkan ke dalam labu ukur 25 mililiter sampai tanda yang ditentukan, dan larutan diisi hingga tanda. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Masing-masing dipipet 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, dan 500 μ L dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a hingga 5 mL. Pindahkan 2 mililiter setiap larutan uji ke dalam botol coklat, dimasukkan ke dalam botol coklat, tambahkan 2 mililiter larutan DPPH, dan kocok hingga homogen. Kemudian, biarkan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya, serapan larutan uji dinilai spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm (Aulia *et al.*, 2023).

4. Persiapan Larutan uji

Untuk membuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm, 50 miligram sampel dilarutkan dengan etanol p.a dan kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mililiter. Kemudian ekstrak etanol atau fraksi air ekstrak etanol daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum) dibuat dalam seri dengan konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, dan 125 ppm. Masing-masing dipipet 125 μ L, 250 μ L, 375 μ L, 500 μ L, dan 625 μ L ke dalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a hingga 5 mL. Pindahkan 2 mililiter setiap larutan uji ke dalam botol coklat, dimasukkan ke dalam botol coklat, tambahkan 2 mililiter larutan DPPH, dan kocok hingga homogen. Kemudian, biarkan diinkubasi pada suhu kamar selama

30 menit. Selanjutnya, serapan larutan uji dinilai spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm (Aulia *et al.*, 2023).

5. Penentuan Persen Inhibisi

Aktivitas penangkal radikal dinyatakan sebagai persen inhibisi yang dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Rihanah & Jura, 2020) :

Persamaan (1):

$$\% inhibisi = \frac{(Absorbansi blanko - Absorbansi sampel)}{Absorbansi blanko} \times 100\%$$

6. Penentuan Nilai IC₅₀

Dari persen peredaman yang diperoleh ditentukan IC₅₀ yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC₅₀ ditentukan dengan rumus :

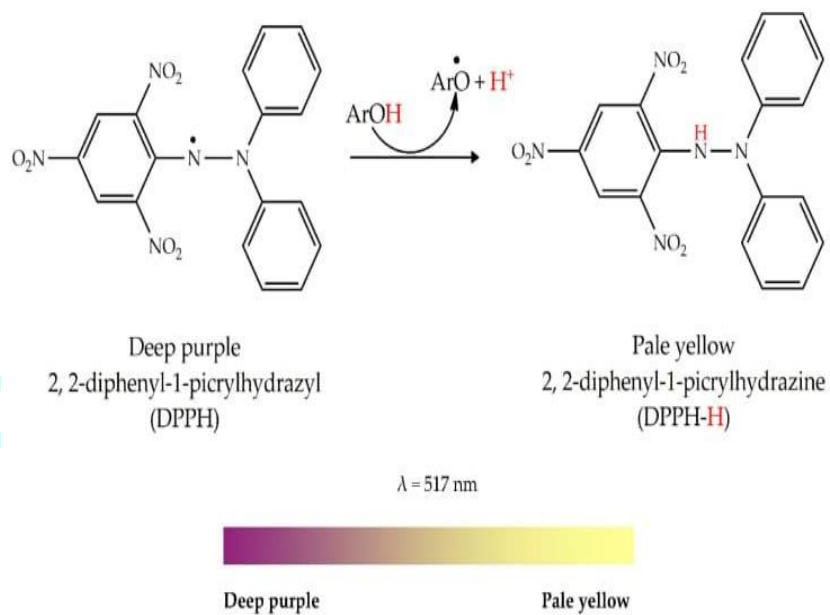
Persamaan (2):

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

Keterangan: a = nilai x pada kurva linear

b = nilai y pada kurva linear

(Norhaslinda *et al.*, 2023)

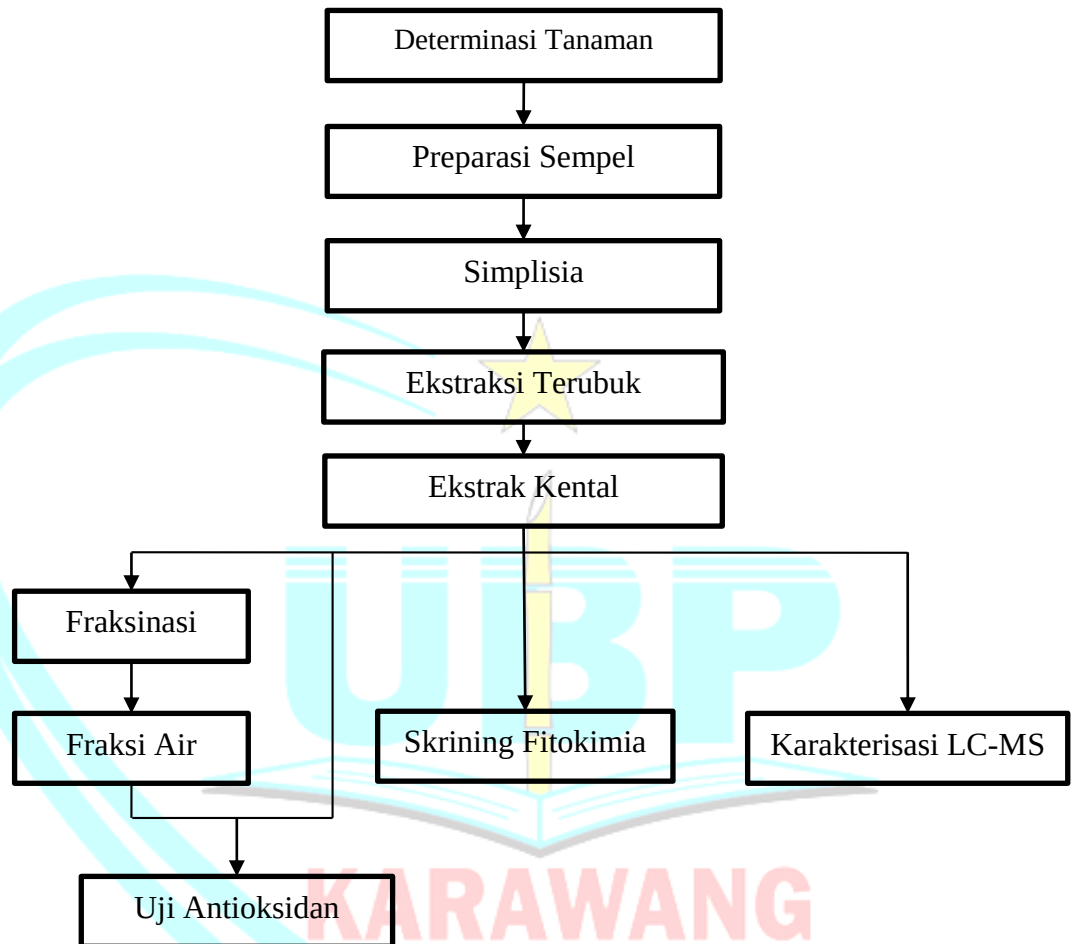


Gambar 3. 1 Reaksi DPPH dan Antioksidan.
(Sadeer *et al.*, 2020)

3.8 Analisis Data

Tiap variasi kelompok diperiksa terhadap hasil terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum.) berupa berupa standarisasi simplisia, uji LC-MS dan Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Data yang diperoleh dianalisis ANOVA dan apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

3.9 Diagram Alur Penelitian



Gambar 3. 2 Diagram Alur Penelitian