

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Agustus 2023 di Laboratorium Terpadu Kampus B Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, jarum ose, corong gelas, rak tabung reaksi, botol kultur, botol vial, pinset, erlenmeyer, gelas beaker, timbangan analitik, kertas saring, kapas, karet gelang, spektrofotometer UV-Vis, mikro pipet, spatula, kuvet, bunsen, lemari pendingin, *rotary evaporator*, *Laminar Air Flow* (LAF), kertas label, mikroskop digital hirox, preparat, wrap, aluminium foil dan autoklaf

3.2.2 Bahan

Adapun bahan yang di gunakan dalam penelitian ini yaitu aquades, spiritus, alkohol 70%, alkohol 90%, NaOCL, etil asetat, methanol, FeCl₃, Magnesium, Wagner, R. Dragendorf, HCl, CH₃COOH, Asam Sulfat, dan Ragen Mayer. kloramfenikol, DPPH (*2-2 difenil-1-picrylhydrazil*), vitamin C, *Potato Dextrosa Agar* (PDA) dan *Potato Dextrosa Broth* (PDB) sebagai media.

3.3 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan metode penelitian kuantitatif eksperimental. Penelitian ini menggunakan jamur endofit yang di ambil dari daun nanas untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) dengan menggunakan indikator media DPPH. Metode penelitian ini dipilih karena untuk mengetahui pengamatan khusus untuk membuktikan keilmiahannya atau sebab akibatnya dari suatu perlukan yang akan diteliti oleh peneliti (Akbar *et al.*, 2023).

3.4 Rancangan Penelitian

Dalam rangkaian penelitian ini desain yang saya gunakan dalam penelitian uji aktivitas antioksidan ekstrak jamur endofit ekstrak jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) ini melalui eksperimental laboratorium dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Yang dimana terdiri dari 7 perlakuan dan 3 kali pengulangan pada setiap perlakuan. Dalam penelitian ini menggunakan konsentrasi perlakuan 1000ppm, 500ppm, 250ppm, 125ppm, 62.5ppm, 31.25ppm, dan 15.625 ppm. Masing-masing perlakuan tersebut dilakukan sebanyak 3x pengulangan.

Adapun perlakuan yang dilakukan dalam penelitian ini, sebagai berikut :

- P₀ : Kontrol (Asam Askorbat)
- P₁ : Perlakuan dengan konsentrasi 1000 ppm dari ekstrak jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).
- P₂ : Perlakuan dengan konsentrasi 500 ppm dari ekstrak jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).
- P₃ : Perlakuan dengan konsentrasi 250 ppm dari ekstrak jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).
- P₄ : Perlakuan dengan konsentrasi 125 ppm dari ekstrak jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).
- P₅ : Perlakuan dengan konsentrasi 62.5 ppm dari ekstrak jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).
- P₆ : Perlakuan dengan konsentrasi 31.25 ppm dari ekstrak jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).
- P₇ : Perlakuan dengan konsentrasi 15.625 ppm dari ekstrak jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).

Pada pengulangan penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali, mengacu kepada rumus Federer (1997), yaitu sebagai berikut :

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(7 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(6) (r - 1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3,5 \sim 3$$

Keterangan :

(t) : Jumlah perlakuan

(r) : Jumlah ulangan

Tabel. 3.1 Kombinasi Perlakuan dan ulangan

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
P ₀	P ₀₁	P ₀₂	P ₀₃
P ₁	P ₁₁	P ₁₂	P ₁₃
P ₂	P ₂₁	P ₂₂	P ₂₃
P ₃	P ₃₁	P ₃₂	P ₃₃
P ₄	P ₄₁	P ₄₂	P ₄₃
P ₅	P ₅₁	P ₅₂	P ₅₃
P ₆	P ₆₁	P ₆₂	P ₆₃
P ₇	P ₇₁	P ₇₂	P ₇₃

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebas yang digunakan adalah jenis jamur endofitik yang diisolat dari daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr). 1000ppm, 500ppm, 250ppm, 125ppm, 62.5ppm, 31.25ppm, dan 15.625ppm.

3.5.2 Variabel Terikat

Pada penelitian ini variabel terikat yang digunakan adalah berupa hasil aktivitas antioksidan ekstrak jamur endofitik yang diisolat dari daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).

3.5.3 Variabel Kontrol

Pada penelitian ini variabel terikat yang digunakan adalah Asam Askorbat (Vitamin C)

3.6 Populasi dan Sampel

3.6.1 Populasi

Populasi yaitu generalisasi yang terdiri atas objek/subjek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulan (Sugiyono, 2019). Populasi dalam penelitian ini adalah jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).

3.6.2 Sampel

Sampel yaitu bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut yang dianggap bisa mewakili seluruh populasi, intinya sampel merupakan bagian dari populasi (Sugiyono, 2019). Sampel dari penelitian ini adalah ekstrak dari jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan Alat dan Bahan

Sebelum memulai penelitian alat dan bahan dipersiapkan terlebih dahulu, alat yang digunakan yaitu alat yang terbuat dari gelas dan non gelas, kemudian adapun bahan yang akan di gunakan yaitu tanaman nanas (*Ananas comosus*) berasal dari Kota Prabumulih. Kemudian yang digunakan yaitu sampel daun dipilih yang segar.

3.7.2 Pembuatan Medium

3.7.2.1 Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Pembuatan media PDA harus sesuai dengan prosedur yang tertara pada kemasan. Medium PDA dibuat dengan menimbang medium sebanyak 39 gram dan dilarutkan dalam 1 liter aquades dalam erlenmeyer. Kemudian medium ditambah dengan kloramfenikol 100µg/ml, setelah itu dipanaskan menggunakan menggunakan hot palte hingga lerutan mendidih atau homogen. Erlenmeyernya tidak lupa

ditutup bagian atasnya dengan kapas dan disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 1atm.

3.7.2.2 Media *Potato Dextrose Broth* PDB

Media PDB terlebih dahulu mencuci kentang sebanyak 200 gram, kemudia dipotong-potong lalu direbus dengan diisi 1 liter air selama 2 jam, dan disaring. Tambahkan air suling kedalam filtrat hingga menjadi 1 liter, tambahkan 20 gram glukosa dan 1 tablet kloramfenikol, aduk hingga menyatu atau homogen kemudian masukan kedalam botol kaca. Masukan media PDB yang sudah steril lalu simpan di lemari penyimpanan steril.

3.7.3 Isolasi

Sampel yang digunakan adalah daun nanas (*Ananas comosus*) dipilih daun yang segar dan tidak bercacat (tidak bernoda/bercak-bercak). Daun dipotong dengan ukuran 2-3 cm menggunakan gunting yang sudah disteril. Selanjutnya dilakukan sterilisasi permukaan yaitu potongan daun lalu direndam dalam NaOCL selama 1 menit kemudian direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, dan bilas menggunakan aquades steril selama 3-5 detik. Potongan daun ditempatkan pada cawan petri yang berisi media PDA. Penanaman sampel dilakukan secara duplo, tiap cawan berisi tiga potongan daun. Media yang telah diinokulasi dengan potongan daun diinkubasi pada suhu ruang selama 4-7 hari (Suhartina *et al.*, 2018).

3.7.4 Pemurnian Jamur

Jamur endofit yang telah tumbuh di medium PDA kemudian dimurnikan ke dalam medium PDA baru dengan cara menginokulasi sedikit hifa dengan ose steril dari setiap koloni endofit yang berbeda. Kultur jamur endofit diinkubasi selama 4-7 hari pada suhu ruang. Pemurnian dilakukan berdasarkan perbedaan secara makroskopis yaitu warna dan bentuk koloni jamur (Suhartina *et al.*, 2018).

3.7.5 Identifikasi Morfologi Jamur

Identifikasi morfologi jamur dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi secara makroskopis jamur yang sudah tumbuh pada media PDA di dalam cawan petri diamati. Pengamatan meliputi mulai dari koloni jamur, tekstur koloni, warna permukaan koloni jamur dan warna bawah koloni jamur. Identifikasi pengamatan mikroskopis, isolat jamur yang telah murni diambil menggunakan jarum ose dan diletakkan ke object glass kemudian tutup dengan cover glass, isolasi yang berada di atas object glass diletakkan dibawah mikroskop. Identifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk hifa, bentuk misilium, spora, ada tidaknya sekat pada hifa, pertumbuhan hifa (bercabang atau tidak bercabang), warna hifa dan konidia (gelap atau hialin transparan), dari jamur dibawah mikroskop, kemudian dicocokkan dengan menggunakan buku identifikasi jamur (Putra *et al.*, 2021 ; Watanabe, 2010).

3.7.6 Kultivasi dan Ekstrasi Jamur

Dimana tahap ini setiap isolat jamur endofit dikultur dalam botol yang berisi media PDB (PDB, komposisi terdiri dari 20 g dekstrosa monohidrat, 200 g kentang, dan 1000 mL aquadest) dan dibiakkan dalam 4 botol kultur 500 mL. Kultur diinkubasi dalam kondisi statis selama empat minggu pada suhu kamar. Setelah itu untuk penyaringan media dan biomassa dipisahkan dengan menggunakan kertas saring. Ekstrak etil asetat diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator. Kemudian ekstrak dipekatkan dalam oven pada suhu 45°C. Lalu ekstrak pekat ditimbang dengan neraca analitik (Elfita *et al.*, 2022).

3.7.7 Ekstrasi Daun

Proses awal maserasi dilakukan dengan menimbang bubuk daun nanas yang sudah diayak menggunakan blender dan dimasukkan ke dalam wadah kaca, kemudian ditambahkan pelarut methanol (perbandingan bubuk daun daun dengan metanol yaitu 1:10) (Bintoro *et al.*, 2017).

Selanjutnya ekstrak disaring menggunakan kertas saring kasar yang menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh

dimasukkan ke dalam labu evaporator untuk dihilangkan pelarut yang terdapat dalam ekstrak sehingga didapatkan ekstrak kental. Hasil pencampuran kedua ekstrak ini dievaporasi pada suhu ± 40 °C dengan tekanan 100 mBar. Evaporasi dihentikan pada saat semua pelarut sudah menguap yang ditandai dengan tidak adanya tetesan uap pelarut. Ekstrak kental yang diperoleh dimasukkan ke dalam botol sampel kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 45°C (Bintoro *et al.*, 2017).

3.7.8 Uji Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan menggunakan metode DPPH. Ekstrak etil asetat jamur endofit dilarutkan dalam metanol hingga konsentrasi 1000ppm, 500ppm, 250ppm, 125ppm, 62,5ppm, 31,25ppm, dan 15,625ppm (tiga kali pengulangan). Untuk 0,2 mL masing-masing konsentrasi, ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 0,5 mM. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan dalam tabung gelap selama 30 menit. Penyerapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis maksimum 516 nm. Asam askorbat digunakan sebagai standar antioksidan. Aktivitas antioksidan dihitung dengan persentase penghambatan penyerapan DPPH dan IC50 nilai (Elfita *et al.*, 2022).

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_k - A_s}{A_s}$$

Di mana:

A_k = Absorbansi kontrol

A_s = Absorbansi sampel

Setelah itu dimasukkan ke persamaan regresi linier untuk mengetahui nilai IC50 dengan rumus:

$$Y = ax + b$$

Keterangan :

Y = Persen penangkapan radikal sampel (inhibisi)

x = Konsentrasi sampel (senyawa uji)

a = Titik potong kurva pada sumbu Y (*Intercep*)

b = Kemiringan kurva (koefisien regresi)

Penentuan Nilai IC50 (*Inhibition Concentration*) Setelah mendapatkan nilai absorbansi dan % inhibisi terhadap DPPH, selanjutnya dilakukan penentuan nilai IC50 dengan memasukkan konsentrasi sebagai X dan % inhibisi sebagai Y sehingga diperoleh nilai a dan b pada persamaan regresi $Y = ax + b$. Kemudian disubstitusikan nilai Y dengan 50 pada persamaan tersebut, dan nilai X yang akan diperoleh sebagai nilai IC50 (Rizikiyan & Pandanwangi, 2019).

3.7.9 Uji Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak isolat jamur endofit dari jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus*). sebanyak 2 ml medium dilarutkan dengan metanol kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 2 ml lalu ditambah dengan HCL 2% kemudian disaring dan ditambahkan beberapa tetes reagen mayer, Menurut (Agustina *et al.*, 2016) jika pada tabung reaksi terbentuknya warna kuning maka hasil tersebut positif adanya alkaloid.

b. Uji Flavonoid

Pada uji flavonoid ekstrak isolat jamur endofit jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus*). Sebanyak 2 ml medium dilarutkan dengan metanol kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 ml, masukan 0,1 gram Mg lalu di tambahkan dengan 3 tetes HCl, Menurut (Ugochukwu *et al.*, 2018) hasil menunjukkan terdapat perubahan warna kuning, orange dan merah menandakan adanya flavanoid.

c. Uji saponin

Pada uji saponin sebanyak 2 ml larutan uji ekstrak isolat dari jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus*) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 2 ml aquadest, setelah itu dikocok secara kuat sehingga terbentuk buih yang stabil setinggi 1 cm. Buih setinggi 1 cm yang terbentuk menandakan adanya kandungan senyawa saponin (Putri *et al.*, 2013)

d. Uji tanin

Pada uji tanin larutan uji ekstrak isolat dari jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus*) sebanyak 2 ml medium dilarutkan dengan metanol dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 ml dididihkan dalam air kemudian disaring. Filtrat ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1% Hasil positif tanin dengan adanya warna biru atau hijau kehitaman (Harahap & Situmorang, 2021).

e. Uji fenol

Pada uji fenol larutan uji ekstrak isolat dari jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus*) ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 ml. Lalu, ditambahkan 3-4 tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif fenol ditunjukkan dengan adanya warna hijau (Mayasani *et al.*, 2019).

f. Uji steroid

Pada uji steroid sebanyak 2 ml larutan uji ekstrak isolat dari jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus*.) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, dilarutkan dengan kloroform dan disaring. Hasil filtrat ditambahkan dengan asam glasias, lalu dipanaskan dan didinginkan. Campuran larutan ditambahkan beberapa tetes asam sulfat, menurut (Putri *et al.*, 2013) hasil positif steroid ditandai dengan adanya warna biru kehijaun.

g. Uji terpenoid

Pada uji terpenoid sebanyak 2 ml larutan uji ekstrak isolat dari jamur endofit daun nanas (*Ananas comosus*) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dimasukkan 0,5 ml kloroform dan di saring. Lalu filtrat ditambahkan dengan beberapa tetes asam sulfat dan dikocok. Terpenoid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna merah (Putri *et al.*, 2013)

3.8 Teknik Pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan teknik pengumpulan data dengan pengamatan dan pengukuran. Pengamatan dalam penelitian ini yaitu dengan melihat, memfoto serta mencatat sejumlah aktivitas tertentu atau situasi tertentu yang berhubungan dengan masalah yang diteliti. Sedangkan

pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk melihat hasil uji antioksidan.

3.9 Analisis data

Data yang diperoleh pada identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis berupa spektrum dan panjang gelombang maksimum, setelah itu data yang di dapat akan dianalisis. Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menghitung persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi dari masing-masing konsentrasi. Setelah didapatkan data persen (%) aktivitas antioksidan pada masing-masing absorbansi sampel, kemudian dilakukan perhitungan nilai IC₅₀ dengan menggunakan persamaan regresi linear dengan cara substitusi $y=ax+b$ yang menyatakan hubungan antara konsentrasi dengan persen (%) aktivitas antioksidan (inhibisi) (Kamoda *et al.*, 2021).

Kemudian dilihat IC₅₀ yang diperoleh, senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC₅₀ kurang dari 10 µg/mL, apabila nilai IC₅₀ antara 50-100 µg/mL kuat, lemah apabila nilai IC₅₀ 100-500 µg/mL, apabila IC₅₀ berkisar antara 500 µg/mL sangat lemah. Analisis data dilakukan dengan deskriptif dengan memperhatikan spektrum dan panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Oktiansyah *et al.*, 2023).