

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Waktu pelaksanaan penelitian skripsi ini dilakukan dari bulan Februari hingga bulan Juli 2023. Adapun tempat dilaksanakan penelitian ini dilakukan di lokasi yang sama, yaitu di Laboratorium Riset Kimia Hayati yang berada di Gedung Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam B (FPMIPA B) lantai 4 dan di Laboratorium Kimia Instrumen yang berada di Gedung Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam A (FPMIPA A atau Gedung JICA) lantai 5.

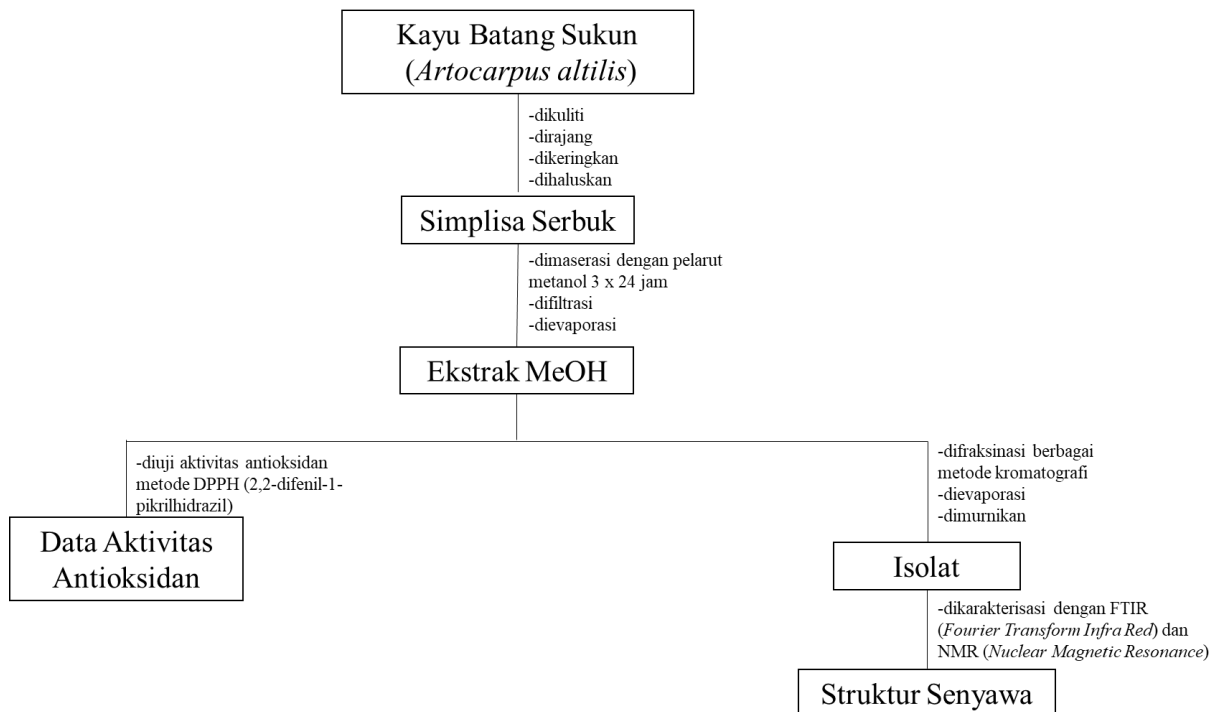
3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam tahap uji aktivitas antioksidan adalah instrumen UV-Vis, abu ukur 100 mL, labu ukur 25 mL, labu ukur 10 mL, mikropipet beserta tip, botol-botol vial kaca, gelas-gelas kimia, dan aluminium foil. Sedangkan peralatan yang digunakan dalam isolasi dan karakterisasi metabolit sekunder meliputi spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red*), spektroskopi NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), gelas-gelas kimia, botol-botol vial berbagai ukuran, dan *chamber* maserasi.

3.3 Bahan

Bahan utama berupa kayu batang tumbuhan sukun (*Artocarpus altilis*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari halaman Rumah Sakit Umum Daerah Majalaya yang terletak di Jl. Cipaku No. 87, Cipaku, Kecamatan Paseh, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Kemudian kayu batang tersebut dipisahkan dari kulit terluarnya untuk selanjutnya dilakukan preparasi hingga diperoleh serbuk simplisia kayu batang tumbuhan sukun (*Artocarpus altilis*). Bahan kimia yang digunakan pada uji aktivitas antioksidan adalah metanol p.a, DPPH, dan asam askorbat. Sedangkan pada tahap isolasi dan karakterisasi metabolit sekunder diperlukan adalah metanol, *n*-heksana, etil asetat, silika gel 60 dan plat untuk uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis).

3.4 Bagan Alir Penelitian



Gambar 3.1 .Bagan alir penelitian.

3.5 Tahapan Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

10 kg sampel kayu batang basah tumbuhan sukun (*Artocarpus altilis*) dikuliti untuk memisahkan kayu batang dari kulit terluarnya. Selanjutnya sampel kayu batang tersebut dirajang untuk memudahkan proses pengeringan. Proses pengeringan dilakukan dengan menyebar sampel diatas terpal plastik yang sebelumnya telah dibersihkan terlebih dahulu. Lalu terpal plastik berisi sampel kayu batang dikeringkan dengan cara dianginkan tanpa terkena sinar matahari langsung selama 10 hari. Kemudian sampel kayu batang yang telah kering selanjutnya digiling untuk memperoleh sampel kayu batang dalam bentuk serbuk.

3.5.2 Ekstraksi

Serbuk kayu batang tumbuhan sukun selanjutnya dimaserasi menggunakan pelarut metanol sebanyak 16 liter selama 3x24 jam. Maserat hasil filtrasi sebanyak 8 liter kemudian dipekatkan menggunakan *rotatory evaporator* sehingga diperoleh ekstrak metanol pekat sebanyak 28,7938 gram. Ekstak pekat metanol inilah yang selanjutnya diuji aktivitas antioksidannya dan dipisahkan dengan berbagai metode kromatografi.

3.5.3 Uji Aktivitas Antioksidan

3.5.3.1 Pembuatan Larutan DPPH 100 ppm

Pembuatan larutan DPPH 100 ppm dilakukan dengan menimbang 10 mg DPPH kemudian dilarutkan menggunakan metanol p.a dan dipindahtuangkan ke dalam labu ukur 100 mL. Metanol p.a ditambahkan hingga tanda batas dan larutan dihomogenkan.

Larutan DPPH 100 ppm kemudian diencerkan untuk memperoleh larutan DPPH 30 ppm. Sebanyak 7,5 mL larutan DPPH 100 ppm dipipet dan dipindahtuangkan ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas dan dihomogenkan.

3.5.3.2 Pengukuran Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Satu botol vial berukuran 10 mL disiapkan lalu seluruh bagian botol ditutup menggunakan alumunium foil. Larutan DPPH 30 ppm sebanyak 1 mL dan metanol p.a sebanyak 3 mL ditambahkan ke dalam botol vial lalu mulut botol vial ditutup menggunakan alumunium foil. Botol vial kemudian diinkubasi di tempat gelap selama 30 menit. Pengukuran serapan maksimum DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang antara 400-800 nm (Misfadhila dkk., 2019).

3.5.3.3 Pembuatan Larutan Sampel dan Larutan Pemanding

Ekstak metanol pekat ditimbang sebanyak 25 mg, kemudian dilarutkan menggunakan metanol p.a dan ditandabatkan pada labu ukur 25 mL

untuk memperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan 1000 ppm tersebut diencerkan masing-masing hingga konsentrasi 50 ppm, 75 ppm, 225 ppm, 250 ppm, 275 ppm, dan 350 ppm dalam labu ukur 10 mL.

Asam askorbat sebagai larutan pembanding ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan menggunakan metanol p.a dan ditandabatkan dalam labu ukur 100 mL serta dihomogenkan. Larutan asam askorbat 100 ppm tersebut diencerkan masing-masing hingga konsentrasi 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm, dan 9 ppm dalam labu 10 mL.

3.5.3.4 Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Larutan sampel ekstrak metanol kayu batang tumbuhan sukun dan larutan pembanding berupa asam askorbat, masing-masing konsentrasi dipipet dengan perbandingan 1:1 antara larutan sampel dan larutan pembanding dengan larutan DPPH 30 ppm menggunakan mikropipet ke dalam botol vial yang sudah dilapisi alumunium foil. Campuran larutan sampel dengan DPPH dan larutan pembanding dengan DPPH selanjutnya diinkubasi di tempat gelap selama 30 menit.

Pengukuran menggunakan spektroskopi UV-Vis menunjukkan serapan maksimal DPPH berada pada panjang gelombang 515 nm. Besaran hambatan serapan radikal bebas dari DPPH dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Abs}_{\text{blanko}} - \text{Abs}_{\text{sampel}}}{\text{Abs}_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Perhitungan nilai IC₅₀ dilakukan dengan perhitungan menggunakan persamaan regresi linier, dimana sumbu X sebagai konsentrasi sampel uji dan sumbu Y sebagai persen inhibisi.

3.5.4 Isolasi Metabolit Sekunder

Ekstrak pekat metanol kayu batang sukun sebanyak 14,3968 dilarutkan kembali menggunakan metanol kemudian dipisahkan dengan berbagai metode

kromatografi hingga diperoleh isolat murni. Adapun metode-metode kromatografi yang dilakukan meliputi kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom gravitasi (KKG), dan kromatografi radial (KR).

3.5.5 Karakterisasi Metabolit Sekunder

Isolat murni yang diperoleh kemudian dikarakterisasi untuk mengidentifikasi struktur senyawanya. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan instrumen FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) dan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*).