

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini berlangsung dari bulan Februari hingga Agustus 2023 dan dilakukan pada empat lokasi yang berbeda. Proses determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Struktur Tumbuhan Departemen Biologi Universitas Pendidikan Indonesia. Selanjutnya, proses pemisahan dan pemurnian senyawa dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati Universitas Pendidikan Indonesia. Terakhir, proses karakterisasi senyawa murni menggunakan spektroskopi NMR dilakukan di Laboratorium Institut Teknologi Bandung, sedangkan karakterisasi gugus fungsi menggunakan FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Universitas Pendidikan Indonesia.

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.2.1 Alat

Dalam penelitian ini, digunakan berbagai macam alat seperti labu ukur 10 mL, labu ukur 25 mL, labu ukur 100 mL, *micro* pipet, timbangan jarum, ember, Erlenmeyer vakum, corong *buchner*, pompa vakum, jerigen 5 L, labu alas bulat 250 mL, neraca analitik, set peralatan *rotary evaporator, chamber*, pinset, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm, batang pengaduk, corong kaca, pipet tetes, cawan penguap, spatula, labu Erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 10 mL, pipet pasteur, set peralatan kolom kromatografi cair vakum, set peralatan kolom kromatografi gravitasi, set peralatan kromatografi radial, botol vial 10 mL, botol vial 25 mL, botol vial 100 mL, gunting, *cutter*, penggaris, pensil, set peralatan UV-Vis, set peralatan FTIR, dan set peralatan spektrometer NMR.

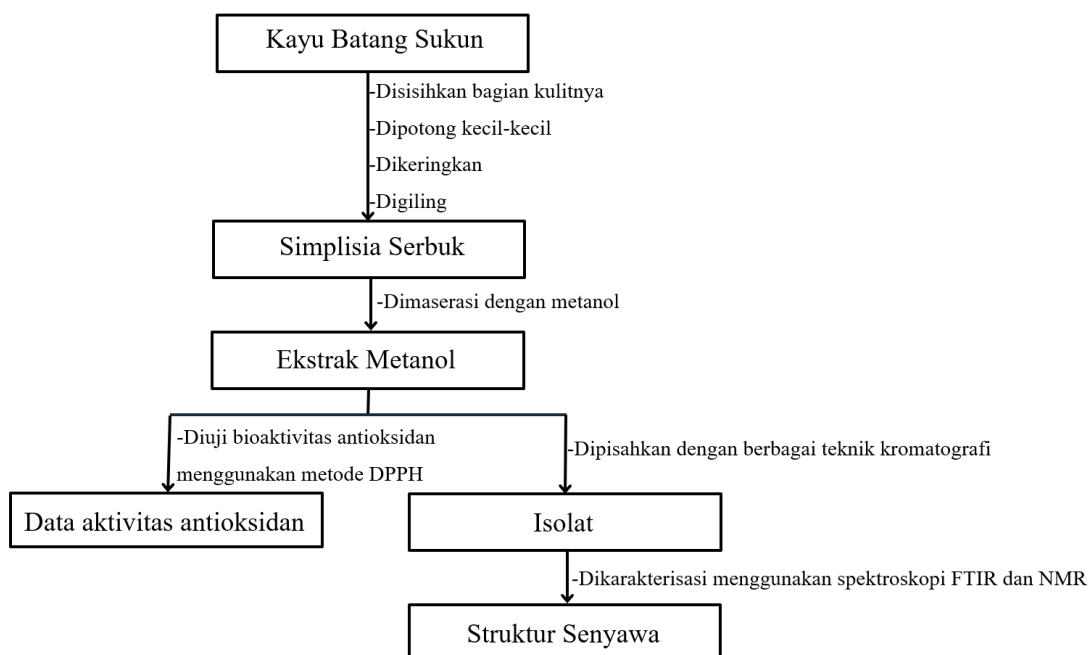
### 3.2.2 Bahan

Sampel bahan tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian kayu batang tumbuhan sukun (*A. altilis*) yang diperoleh pada bulan Februari 2023 dari daerah Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Sampel tumbuhan sukun kemudian dideterminasi di Laboratorium Struktur Tumbuhan Departemen Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia.

Bahan-bahan lain yang turut digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu metanol, DPPH, asam askorbat, selotip, kertas saring, *sealtape*, plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub>, pipa kapiler, tisu, n-heksana, etil asetat, aseton, silika gel 60 ukuran 70-230 mesh untuk impregnasi dan *packing* kolom kromatografi gravitasi, silika gel 60 GF<sub>254</sub> untuk *packing* kolom kromatografi cair vakum, aluminium foil, plastik *wrap*, dan diisopropil eter.

## 2.2 Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan dalam penelitian ini diantaranya preparasi sampel, pemisahan senyawa, pemurnian senyawa, dan karakterisasi senyawa hasil isolasi, seperti ditunjukkan pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1.** Bagan alir penelitian.

### 3.3.1 Preparasi Sampel Kayu Batang Sukun (*A. altilis*)

Pada penelitian ini, kayu batang sukun (*A. altilis*) diperoleh pada bulan Februari 2023 dari daerah Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Bagian kulit dari batang sukun dipisahkan, sehingga hanya tersisa bagian kayu batang. Kemudian, bagian kayu batang tersebut dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah proses pengeringan selesai, sampel digiling hingga menjadi simplisia serbuk.

### 3.3.2 Ekstraksi Sampel Kayu Batang Sukun (*A. altilis*)

Sebanyak 2,0 kg simplisia serbuk kayu batang sukun dimaserasi selama 3x24 jam menggunakan 16 L metanol. Setelah itu, maserat hasil filtrasi dipekatkan menggunakan evaporator vakum, sehingga diperoleh ekstrak metanol perkat sebanyak 28,8 g. Sebanyak 25 mg ekstrak metanol digunakan untuk dilakukan uji aktivitas antioksidan. Selain itu, 14,3 g sampel pekat dilarutkan menggunakan aseton untuk selanjutnya dipisahkan dengan berbagai teknik kromatografi.

### 3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

#### Pembuatan Larutan DPPH 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$

DPPH sebanyak 10 mg dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Larutan ini kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (P, 2004).

#### Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Larutan DPPH (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dipipet sebanyak 3 mL ke dalam vial, kemudian ditambahkan metanol sebanyak 1 mL dan dihomogenkan. Vial ditutup dengan aluminium foil kemudian diinkubasi selama 30 menit. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Misfadhila et al., 2019).

### **Pembuatan Larutan Sampel**

Ekstrak metanol kayu batang sukun sebanyak 25 mg dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 25 mL sehingga didapatkan larutan sampel dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan ini kemudian diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 50 µg/mL, 225 µg/mL, 250 µg/mL, 350 µg/mL dan 400 µg/mL.

### **Pembuatan Larutan Pembanding**

Sebanyak 10 mg asam askorbat dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 µg/mL. Larutan ini kemudian diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 4 µg/mL, 5 µg/mL, 6 µg/mL, 7 µg/mL dan 9 µg/mL.

### **Pengukuran Aktivitas Antioksidan**

Larutan sampel dan larutan pembanding masing-masing konsentrasi dipipet menggunakan *micro* pipet sebanyak 2 mL dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH 30 µg/mL, kemudian dimasukkan ke dalam vial dan ditutup dengan aluminium foil. Campuran dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap. Serapan masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah diukur sebelumnya. Untuk mengetahui nilai %inhibisi, dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{inhibisi radikal DPPH} = \frac{\text{serapan blanko} - \text{serapan sampel}}{\text{serapan blanko}} \times 100$$

Setelah mendapatkan persentase inhibisi (%inhibisi), kemudian memplotnya dalam sebuah kurva yang memperlihatkan hubungan dengan konsentrasi. Dari kurva tersebut, kita dapat memperoleh persamaan garis lurus (linear). Nilai IC<sub>50</sub> dapat dihitung dengan mensubstitusikan nilai 50 terhadap y pada persamaan garis lurus yang didapat, dan mencari nilai x yang merupakan nilai IC<sub>50</sub>.

### 3.3.4 Pemisahan dan Pemurnian Senyawa

Proses pemisahan dan pemurnian senyawa dilakukan dengan menggunakan berbagai teknik kromatografi, diantaranya kromatografi cair vakum, kromatografi kolom gravitasi, dan kromatografi radial.

Pada tahap awal pemisahan digunakan teknik kromatografi cair vakum dengan kolom berdiameter 7 cm. Eluen yang digunakan yaitu campuran *n*-heksana dan etil asetat pada berbagai perbandingan volume. Setelah dua kali pemisahan dengan menggunakan kolom KCV berdiameter 7 cm, pemisahan dilanjutkan dengan teknik KCV menggunakan kolom yang berdiameter 3 cm. Selanjutnya, senyawa-senyawa dipisahkan menggunakan metode kolom kromatografi gravitasi dengan eluen *n*-heksana dan diisopropil eter. Proses pemurnian dilanjutkan dengan kromatografi radial menggunakan eluen *n*-heksana dan diisopropil eter pada berbagai perbandingan. Setiap fraksi hasil pemisahan dari berbagai teknik kromatografi tersebut kemudian diuji menggunakan kromatografi lapis tipis, setiap spot yang memiliki kemiripan pola noda akan digabungkan menjadi satu fraksi.

### 3.3.5 Karakterisasi Isolat

Senyawa murni hasil isolasi (isolat 1) dikarakterisasi menggunakan spektroskopi FTIR yang dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Universitas Pendidikan Indonesia dan spektroskopi <sup>1</sup>H-NMR yang dilakukan di Laboratorium Institut Teknologi Bandung.