

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Juli 2024 di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Gedung Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOTB), Kawasan Sains dan Teknologi BJ Habibie Serpong, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN).

### **3.2 Alat dan Bahan**

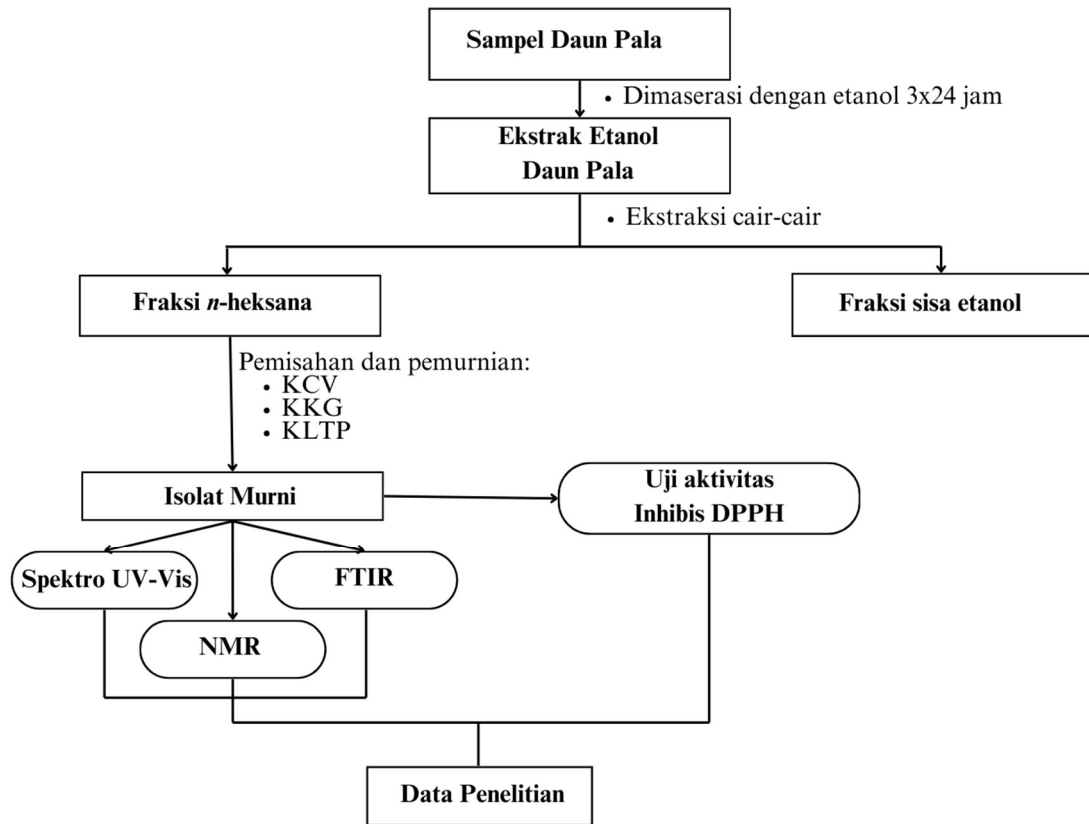
#### **3.2.1 Alat**

Peralatan yang digunakan pada tahapan isolasi dan pemurnian dalam penelitian ini adalah neraca analitik (Mettler Toledo<sup>®</sup>), corong pisah, corong kaca, gelas kimia, labu Erlenmeyer, labu dasar bulat, pipa kapiler, pipet tetes, batang pengaduk, spatula, botol vial, gelas ukur, chamber kromatografi lapis tipis (CAMAG<sup>®</sup>), set *rotary vacuum evaporator* (BUCHI), set Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan kolom diameter 6,5 cm, kolom kromatografi gravitasi dengan diameter 2 cm, dan kotak lampu UV 254 nm dan 366 nm (CAMAG<sup>®</sup>). Selain itu, peralatan yang digunakan pada tahap uji bioaktivitas dan karakterisasi diantaranya, kuvet, mikropipet (Socorex<sup>®</sup> dan Eppendorf<sup>®</sup>), cawan petri, spektrofotometer UV-Vis (Agilent), spektrofotometer FTIR (BRUKER<sup>®</sup>) dan spektrofotometer NMR (BRUKER<sup>®</sup>).

#### **3.2.2 Bahan**

Bahan utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun pala (*Myristica fragrans* Houtt). Adapun, bahan-bahan kimia lainnya yang digunakan pada penelitian ini adalah pelarut metanol teknis dan pro analisis, etanol pro analisis, n-heksana teknis dan pro analisis, etil asetat teknis dan pro analisis. Selain itu, pada tahapan isolasi dan pemurnian digunakan bahan-bahan berupa silika gel 60G F<sub>254</sub> untuk KCV dan KKG, silika gel berukuran 0,2-0,5 mm untuk impregnasi pada KCV, pelat KLT silika gel 60 (Merck<sup>®</sup>) dan pelat silika gel 60 RP-18 (Merck<sup>®</sup>).

### 3.3 Alur Kerja Penelitian



**Gambar 3.1** Bagan alir penelitian

### 3.4 Tahap Penelitian

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu ekstraksi, pemisahan dan pemurnian, pengujian antioksidan, dan karakterisasi senyawa aktif hasil isolasi.

#### 3.4.1 Ekstraksi dan Fraksinasi

Daun tumbuhan pala (*Myristica fragrans Houtt*) yang sudah dikeringkan dan dihaluskan hingga menjadi serbuk simplisia di ekstraksi sebanyak 2 kg. Serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol teknis selama 3x24 jam. Ekstrak etanol kemudian dipekatkan menggunakan evaporator vakum. Ekstrak etanol yang sudah dipekatkan kemudian ditimbang untuk mendapatkan massa total ekstrak total.

### 3.4.2 Pemisahan dan Pemurnian

Fraksinasi dilakukan dengan proses partisi menggunakan corong pisah. Dalam corong pisah, 306 g ekstrak sebelumnya dilarutkan dalam akuades:etanol dengan perbandingan 1:4, kemudian ditambahkan *n*-heksana. Campuran tersebut dihomogenkan dan dibiarkan sampai terbentuk dua lapis yakni lapisan air dan lapisan *n*-heksana. Lapisan *n*-heksana dipisahkan dan dikumpulkan, selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporato* pada rentang suhu 40-50°C (Fajriah & Megawati, 2015).

Fraksi *n*-heksana kemudian ditimbang sebanyak 25 gram, dilarutkan dalam kloroform dan diimpregnasi ke dalam silika gel berukuran 0,2-0,5 mm untuk dipisahkan dengan kromatografi cair vakum. Fraksi *n*-heksana yang telah diimpregnasi selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV). Eluen yang digunakan dalam KCV menggunakan sistem elusi gradien. Hasil fraksinasi KCV pada fraksi *n*-heksana juga dianalisis kembali dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi hasil KCV dengan pola noda KLT yang sama kemudian digabungkan dan dipekatkan kembali menggunakan rotari vakum evaporator dan ditimbang massanya. Fraksi gabungan KCV selanjutnya dimurnikan kembali dengan metode Kromatografi kolom gravitas (KKG) dan KLT Prepartaif hingga mendapatkan fraksi akhir berupa isolat murni. Eluen kromatografi dipilih sedemikian rupa sehingga sesuai untuk tahapan pemurnian.

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perkiraan jumlah komponen yang dapat diisolasi, penetapan jenis-jenis eluen yang seuai untuk tahapan pemisahan atau pemurnian selanjutnya, dan identifikasi kemurnian fraksi hasil isolasi.

### 3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan radikal DPPH oleh senyawa hasil isolasi. Parameter pengukuran aktivitas penghambatan ini dinyatakan dinyatakan dalam  $IC_{50}$  (*inhibition concentration*), yaitu konsentrasi senyawa antioksidan yang menyebabkan hilangnya aktivitas radikal DPPH sebanyak 50%. Berdasarkan

parameter dinyatakan bahwa semakin rendah nilai IC<sub>50</sub> suatu senyawa maka aktivitas antioksidannya semakin baik.

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini didasarkan pada penerimaan elektron atau radikal hidrogen oleh senyawa antioksidan menjadi molekul yang stabil yang reaksinya ditunjukkan dengan penurunan absorpsi dan pemudaran warna dari ungu menjadi kuning. Pengujian ini dilakukan menggunakan spektrometer UV-Vis pada panjang gelombang 515-517 nm (Moon dan Shibamoto, 2009). Pada penelitian ini, uji antioksidan dilakukan terhadap kuersetin sebagai kontrol positif dan senyawa antioksidan hasil isolasi.

Pengujian dimulai dengan cara membuat larutan kuersetin dengan berbagai konsentrasi (2,5, 5, 10, dan 20) ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 500 µL kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan DPPH 40 ppm dalam metanol sebanyak 500 µL dan tambahkan metanol 1500 µL. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorpsi diukur pada panjang gelombang maksimal DPPH (515-517 nm).

Pengujian aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi diperlakukan mirip seperti kuersetin, dengan cara membuat larutan sampel dengan berbagai konsentrasi yaitu (5, 10, 20, dan 50) ppm dan memipetnya masing-masing 500 µL kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan DPPH 40 ppm dalam metanol sebanyak 500 µL dan tambahkan metanol 1500 µL. Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 500 µL dan metanol 2000 µL. Campuran dihomogenkan dengan *shaker* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit.

Pengukuran absorpsi sampel pada penelitian ini dilakukan sebanyak tiga kali pengukuran (triplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung persen inhibisi radikal bebas (Q). Persen inhibisi dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut (Zarai *et al.*, 2013):

$$Q = 100 \left( \frac{A_o - A_c}{A_o} \right)$$

Keterangan:

Q = Persen inhibisi aktivitas radikal bebas

A<sub>o</sub> = Absorbansi kontrol (pelarut+DPPH)

A<sub>c</sub> = Absorbansi sampel (sampel + DPPH)

Penentuan nilai  $IC_{50}$  sampel dilakukan dengan cara memplot persen inhibisi aktivitas radikal bebas terhadap konsentrasi sampel sehingga diperoleh suatu persamaan regresi sebagai berikut:

$$Y = mx + c$$

Keterangan :

Y = persen inhibisi

m = *slope*

x = *intercept* ( $IC_{50}$ )

c = konsentrasi sampel

Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dengan memasukkan nilai Y = 50 serta nilai m dan c yang diperoleh dari persamaan garis, sehingga nilai x sebagai  $IC_{50}$  dapat dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$IC_{50} = \frac{50 - c}{m}$$

#### 1) Pembuatan larutan DPPH

Sebanyak 0,4 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL larutan metanol lalu disimpan di dalam vial gelap sehingga didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 40  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 2) Pembuatan larutan kuersetin

Kuersetin sebagai antioksidan pembanding ditimbang sebanyak 1 mg dan dilarutkan dalam 1 mL metanol sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Selanjutnya dari larutan induk dibuat variasi konsentrasi larutan 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , dan 20  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 3) Persiapan larutan sampel

Larutan stock sampel dibuat dengan melarutkan 1 mg sampel dalam 1 mL metanol sehingga di dapatkan konsentrasi larutan sampel 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4) Pengujian aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan tabung reaksi dan kuvet dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) (Dewi et al., 2012).

### 3.5 Karakterisasi Senyawa

Struktur senyawa murni atau senyawa hasil isolasi ditentukan berdasarkan metode spektroskopi, meliputi spektrometer UV-Vis, spektrometer *Fourier*

Ziyan Saputra, 2024

ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA GOLONGAN LIGNAN DARI FRAKSI N-HEKSANA DAUN PALA (*MYRISTICA FRAGRANS HOUTT.*) DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDANNYA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

*Transform Infra Red* (FTIR), dan spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR).

### **3.6 Analisa Data**

Analisa data dilaksanakan dengan mengkaji hasil isolasi dari fraksi *n*-heksana daun pala (*Myristica fragrans* Houtt) serta uji aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi *n*-butanol, dan isolat murni yang telah dilakukan menggunakan persamaan regresi yang dinyatakan dalam nilai IC<sub>50</sub>. Subfraksi hasil pemisahan melalui kromatografi cair vakum dan kromatografi gravitasi dinyatakan dalam nilai absorbansi (%). Selanjutnya nilai aktivitas antioksidan dibandingkan dengan pembanding. Data yang telah dianalisis dinarasikan dalam bentuk pembahasan.