

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun (*Artocarpus communis*) berwarna hijau tua yang tumbuh di pinggir Jalan Terusan, Cimahi Tengah, Jawa Barat. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Juli 2019 di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati, Laboratorium Kimia Instrumen, Laboratorium Kimia Dasar Analisis Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI), Sekolah Ilmu Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (SITH ITB), dan Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Bandung.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada tahap uji kadar air, kadar abu total, kadar abu tak larut asam, cemaran logam adalah alat-alat gelas, oven, neraca analitik, cawan krus bertutup, pembakar bunsen, *furnace*, *hotplate*, desikator, gelas-gelas steril, *loopful* dan Spektrofotometer AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi adalah alat-alat gelas, penguap putar bervakum, alat soxhlet dan *freeze dryer*. Peralatan yang digunakan pada tahap analisis metabolit sekunder adalah alat-alat gelas, *hotplate*, set peralatan KLT, dan spektrofotometer FTIR Shimadzu 8400. Peralatan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah alat-alat gelas, pipet dan spektronik UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun yang telah dipreparasi menjadi serbuk simplisia. Bahan kimia yang digunakan pada tahap uji kadar air, kadar abu total, kadar abu tak larut asam, cemaran logam, dan ekstraksi adalah n-heksana yang telah didestilasi, aquades, asam klorida, kertas saring tak berabu (Whatman no 40). Bahan kimia yang digunakan pada tahap analisis metabolit sekunder adalah aquades, n-heksana, etil asetat, metanol, diklorometan dan asetonitril. Bahan kimia yang digunakan pada tahap uji aktivitas antioksidan adalah DPPH(1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), metanol p.a dan asam askorbat.

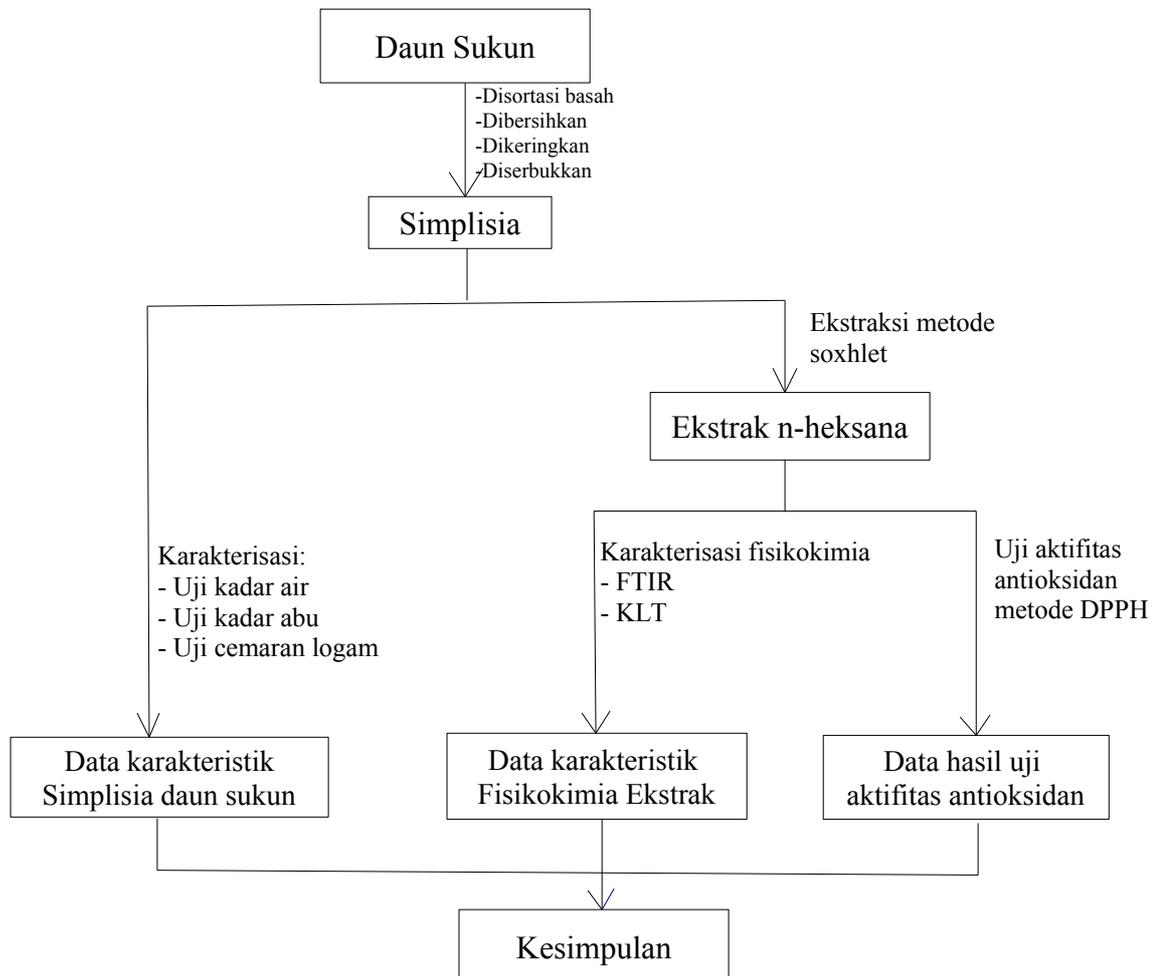
Endah Puspita, 2019

PROFIL FISIKOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK N-HEKSANA DAUN SUKUN (*Artocarpus communis*) ASAL JAWA BARAT

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

3.3 Prosedur Penelitian

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini secara umum dapat dilihat dalam bentuk bagan alir pada **Gambar 3.1**



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Karakterisasi Simplisia Daun Sukun

Karakterisasi yang dilakukan terhadap simplisia daun sukun meliputi beberapa parameter uji, seperti penentuan kadar air, kadar abu total, kadar abu tak larut asam, cemaran logam, dan analisis metabolit sekunder.

Endah Puspita, 2019

PROFIL FISIKOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK N-HEKSANA DAUN SUKUN
(*Artocarpus communis*) ASAL JAWA BARAT

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

3.3.1.1 Penentuan Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan mengacu pada prosedur SNI 01-2891-1992 tentang cara uji makanan dan minuman, dengan metode oven. Simplisia daun sukun ditimbang 1-2 gr pada botol timbang bertutup yang sudah diketahui bobotnya. Kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu 105°C selama 3 jam, lalu didinginkan dalam desikator. Setelah itu ditimbang dan diulangi hingga diperoleh bobot yang tepat.

$$\% \text{ kadar air} = \frac{W_1}{W} \times 100 \quad \%$$

W = bobot cuplikan sebelum dikeringkan (gr)

W₁ = kehilangan bobot sebelum dikeringkan (gr)

3.3.1.2 Penentuan Kadar Abu Total

Penentuan kadar abu total dilakukan mengacu pada prosedur SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Simplisia daun sukun ditimbang sebanyak 2-3 gr dalam cawan porselen yang telah diketahui bobotnya. Kemudian diarakkan diatas nyala pembakaran, lalu diabukan dalam furnace pada suhu 550°C sampai pengabuan sempurna. Setelah itu didinginkan dalam desikator, ditimbang dan diulangi hingga diperoleh bobot tetap,

$$\% \text{ kadar abu total} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100 \quad \%$$

W = bobot contoh sebelum diabukan (gr)

W₁ = bobot contoh + cawan sesudah diabukan (gr)

W₂ = bobot cawan kosong (gr)

3.3.1.3 Penentuan Kadar Abu Tak Larut Dalam Asam

Prosedur kadar abu tak larut dalam asam dilakukan mengacu pada prosedur SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Abu bekas penentuan kadar abu total dilarutkan dalam 25 ml HCl 10%. Kemudian dididihkan selama 5 menit, lalu disaring dengan kertas saring tak berabu dan dicuci dengan air suling sampai bebas klorida. Setelah itu letakkan kertas saring dalam cawan

Endah Puspita, 2019

PROFIL FISIKOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK N-HEKSANA DAUN SUKUN (Artocarpus communis) ASAL JAWA BARAT

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

porselen yang sudah diketahui bobotnya dan dikeringkan dalam oven sampai menjadi abu. Dinginkan cawan dalam desikator hingga suhu kamar, lalu timbang dan diulangi hingga diperoleh bobot tetap.

$$\% \text{ kadar abu tak larut dalam asam} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100 \quad \%$$

W = bobot cuplikan (gr)

W₁ = bobot cawan + abu (gr)

W₂ = bobot cawan kosong (gr)

3.3.1.4 Penentuan Cemarkan Logam Berat

Penentuan cemarkan logam yang dilakukan terhadap simplisia meliputi penentuan cemarkan Timbal (Pb), Kadmium (Cd), Arsen (As) dan Raksa (Hg). Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) mengacu pada prosedur AOAC 999.11-2005 *Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods*. Arsen (As) mengacu pada prosedur SNI 01-4866-1998 tentang Cara Uji Cemarkan Arsen dalam Makanan. Raksa (Hg) mengacu pada prosedur SNI 19-2896-1998 tentang Cara Uji Cemarkan Logam dalam Makanan.

3.3.1.4.1 Penentuan Cemarkan Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd)

Pada prinsipnya, penentuan cemarkan timbal dan kadmium dilakukan dengan mengeringkan dan mengabukan sampel pada suhu 450°C dengan peningkatan suhu secara bertahap ($\leq 50^\circ\text{C}/\text{jam}$). Ditambahkan dalam HCl 6M (1+1) dan larutan diuapkan hingga kering. Residu dilarutkan dalam HNO₃ 0,1 M dan analit ditentukan dengan prosedur menggunakan *flame* dan grafit *furnace*.

Penentuan cemarkan timbal dilakukan dengan cara ditimbang 10-20 gr sampel dalam cawan. Dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C. Kemudian dilanjutkan sesuai dengan tipe tungku yang digunakan. Pada tahap pengabuan, cawan ditempatkan dalam *furnace* pada suhu awal $\leq 100^\circ\text{C}$, lalu suhu dinaikkan secara bertahap $\leq 50^\circ\text{C}/\text{jam}$ hingga mencapai 450°C dan dibiarkan selama 8 jam atau semalaman. Dibuat larutan standar Pb dengan melarutkan 1,000 gr Pb dalam 7 ml HNO₃ 65% dalam labu takar 1 L dan ditandabatkan dengan aquades. Dibuat

Endah Puspita, 2019

PROFIL FISIKOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK N-HEKSANA DAUN SUKUN
(*Artocarpus communis*) ASAL JAWA BARAT

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

larutan standar Cd dengan melarutkan 1,000 gr Cd dalam 14 ml aquades + 7ml HNO₃ 65% dalam labu takar 1 L dan ditandabatkan dengan aquades.

Pra-pengabuan dilakukan pada sampel dengan menempatkan cawan berisi sampel dengan penutup kaca pada piring keramik dan dibiarkan udara bersih keluar melalui tabung kaca menyapu sampel. Simpan lampu IR pada penutup. Sampel pra-pengabuan meningkat suhunya secara perlahan dengan lampu IR secara bertahap meningkatkan suhu pada *hot plate* hingga maksimum. Suhu akhir pada piring keramik berada pada sekitar 300°C. Waktu yang diperlukan untuk pra-pengabuan bervariasi tergantung sampel. Simpan cawan dalam *furnace* pada suhu 200-250°C dan secara perlahan suhunya ditingkatkan hingga 450°C dengan laju $\leq 50^\circ\text{C}/\text{jam}$. Biarkan cawan dalam *furnace* selama 8 jam atau semalaman. Lalu, keluarkan cawan dari *furnace* dan biarkan dingin. Basahi abu dengan 1-3 ml air dan pekatkan menggunakan *hot plate*. Simpan kembali cawan dalam *furnace* pada suhu $\leq 200^\circ\text{C}$ dan naikkan suhu ($50\text{-}100^\circ\text{C}/\text{jam}$ hingga 450°C. Dilanjutkan dengan pengabuan pada suhu 450°C selama 1-2 jam. Ulangi prosedur hingga sampel benar-benar menjadi abu (abu berwarna putih/abu atau hingga sedikit berwarna). Jumlah pengulangan bervariasi bergantung pada jenis sampel. Tambahkan 5 ml HCl 6M untuk memastikan bahwa semua abu bersentuhan dengan asam. Pekatkan asam menggunakan *hot plate*. Larutkan residu dalam 10,0-30,0 ml HNO₃ 0,1M. Aduk dengan hati-hati hingga semua abu bersentuhan dengan asam. Tutup dengan kaca arloji dan biarkan selama 1-2 jam. Kemudian aduk larutan dalam wadah dengan batang pengaduk, kemudian dengan cara yang sama seperti sampel, menggunakan dua blanko dengan masing-masing *batch* analitis. Digunakan grafit *furnace* AAS untuk penentuan Pb dan Cd. Pada Pb digunakan panjang gelombang 283,3 nm dan untuk Cd digunakan panjang gelombang 228,8 nm.

3.1.3.1.4.2 Penentuan Cemaran Arsen (As)

Penentuan cemaran arsen dilakukan dengan cara pengabuan kering. Ditimbang 10 gr sampel dalam cawan, lalu ditambahkan 2,5 gr Mg(NO₃)₂·2H₂O

Endah Puspita, 2019

PROFIL FISIKOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK N-HEKSANA DAUN SUKUN
(*Artocarpus communis*) ASAL JAWA BARAT

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

dan 25 ml HNO₃ p.a diaduk dengan sempurna dan diuapkan diatas penangas air hingga kering. Kemudian diarangkan dalam *furnace* pada suhu 500°C. Setelah itu dilarutkan dengan larutan HCl 1:3 dan tandabataskan dengan aquades hingga 50 ml.

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan metode AAS. Disiapkan larutan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan alat. Dipipet 25 ml larutan destruksi yang telah dibuat dan ditambahkan 2 ml HCl 8M dan 0,1 ml KI 20% kemudian dibiarkan selama minimal 2 menit. Diukur absorbansi larutan sampel. Larutan deret standar, dan larutan blanko dengan AAS.

3.1.3.1.4.3 Penentuan Cemaran Raksa (Hg)

Pada prinsipnya, penentuan cemaran raksa dilakukan dengan mereaksikan senyawa raksa dengan larutan pereduksi (NaBH₄ atau SnCl₂) dalam keadaan asam guna membentuk gas atomik Hg dan diikuti dengan pembacaan absorban menggunakan AAS tanpa nyala dengan panjang gelombang 253,7 nm.

Penentuan cemaran raksa dilakukan dengan cara pengabuan basah. Ditimbang 5 gr sampel ke dalam labu destruksi, ditambahkan 25 ml H₂SO₄ 18N, 20 ml HNO₃ 7N, 1 ml larutan natrium molibdat 2% dan 5-6 butir batu didih. Dihubungkan labu destruksi dengan pendingin dan dipanaskan selama 1 jam kemudian didinginkan selama 15 menit. Setelah itu ditambahkan 20 ml HNO₃-HClO₄ (1:1) melalui pendingin. Dihentikan aliran air pada pendingin dan dipanaskan dengan panas tinggi hingga timbul air uap putih, lalu dilanjutkan pemanasan selama 10 menit, kemudian didinginkan. Setelah itu, ditambahkan 10 ml air melalui pendingin dengan menggoyang-goyangkan labu dan dididihkan selama kembali selama 10 menit. Kemudian pemanasan dihentikan dan pendingin dicuci dengan 15 ml aquades sebanyak 3 kali, didinginkan sampai suhu kamar.

Larutan destruksi sampel dipindahkan secara kuantitatif kedalam labu ukur 100 ml dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas. Selain itu, dibuat blanko dengan cara mencampurkan seluruh pereaksi yang ditambahkan pada sampel dan larutan deret standar raksa. Setelah itu, ditambahkan 20 ml larutan

pereduksi kedalam larutan deret standar, larutan dekstruksi dan larutan blanko. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan AAS tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.

3.3.2 Karakterisasi Fisikokimia Ekstrak n-Heksana Daun Sukun

Karakterisasi fisikokimia yang dilakukan pada daun sukun berupa analisis golongan metabolit sekunder dan penentuan jumlah komponen senyawa yang ada meliputi, pengekstraksian senyawa metabolit sekunder pada daun sukun, analisis spektrum FTIR, serta pengujian KLT.

3.3.2.1 Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan pada sampel daun sukun yang telah disortasi basah, dikeringkan dan diserbukan sebanyak 300 gr, diekstraksi dengan pelarut n-heksana sebanyak 300 ml. Ekstraksi dilakukan dengan cara ekstraksi panas menggunakan alat soxhlet selama 3x12 jam/50 gr simplisia pada suhu didih air. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan menggunakan *vacuum rotatory evaporator* untuk menguapkan pelarutnya.

3.3.2.2 Kromatografi Lapis Tipis

Analisis komponen senyawa pada ekstrak n-heksana daun sukun dilakukan dengan KLT menggunakan eluen n-heksana, etil asetat, metanol, dan diklorometan pada sistem fasa normal dan eluen metanol, air, dan asetonitril pada sistem fasa terbalik. Ekstrak dilarutkan dalam heksana, kemudian ditotolkan pada plat KLT berukuran 5 cm x 1 cm menggunakan pipa kapiler yang sudah diberi tanda batas bawah dan batas atas. KLT yang telah ditotolkan ekstrak dimasukkan ke *chamber* tertutup yang sudah diberi campuran eluen n-heksana: etil asetat dengan berbagai perbandingan 1:1, 7:3, 8:2, etil asetat: metanol dengan perbandingan 9:1, diklorometan: metanol dengan perbandingan 9:1, metanol: asetonitril dengan perbandingan 1:1, metanol: air dengan perbandingan 1:1, dan metanol 100%, dengan posisi berdiri, dimana sebelumnya *chamber* telah

Endah Puspita, 2019

**PROFIL FISIKOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK N-HEKSANA DAUN SUKUN
(*Artocarpus communis*) ASAL JAWA BARAT**

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

dijenuhkan dengan cara memasukkan kertas saring hingga kertas saring terelusi seluruhnya oleh eluen. Setelah itu divisualisasikan dengan sinar UV 254 nm untuk diamati berapa banyak noda yang terpisah pada plat. Lalu dihitung nilai Rf untuk tiap noda.

3.3.3 Uji Aktifitas Antioksidan

Uji aktifitas antioksidan ekstrak n-heksana daun sukun dilakukan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dengan asam askorbat untuk verifikasi metode, sesuai dengan metode yang digunakan oleh Brand-William dkk. (1995), serta Riasari dkk. (2015) dengan modifikasi.

Pengujian dimulai dengan cara membuat larutan asam askorbat dalam metanol dengan berbagai konsentrasi yaitu (2, 4, 6, 8, 10) ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml kedalam botol vial kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 60 ppm dalam metanol. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian ekstrak n-heksana daun sukun diperlakukan sama seperti asam askorbat, dengan cara membuat larutan ekstrak dalam metanol dengan berbagai konsentrasi yaitu (10, 20, 30, 40, 50) ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml kedalam botol vial, kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 60 ppm dalam metanol. Kontrol yang digunakan yaitu 2 ml DPPH dan 4 ml metanol.

Pengukuran absorbansi pada penelitian ini dilakukan sebanyak dua kali (duplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung persen inhibisi aktifitas radikal bebas (Q). Persen inhibisi dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$Q = \frac{A_o - A_c}{A_o} \times 100 \%$$

ket: Q = Persen inhibisi aktifitas radikal bebas
 A₀ = Absorbansi Kontrol (Pelarut + DPPH)
 A_c = Absorbansi sampel (Sampel + DPPH)

Endah Puspita, 2019

PROFIL FISIKOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK N-HEKSANA DAUN SUKUN (Artocarpus communis) ASAL JAWA BARAT

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

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

$$Y = mx + c$$

ket: 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:

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