

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan yaitu pada bulan Februari sampai Juli 2019. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati, Laboratorium Kimia Dasar dan Analitik, dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

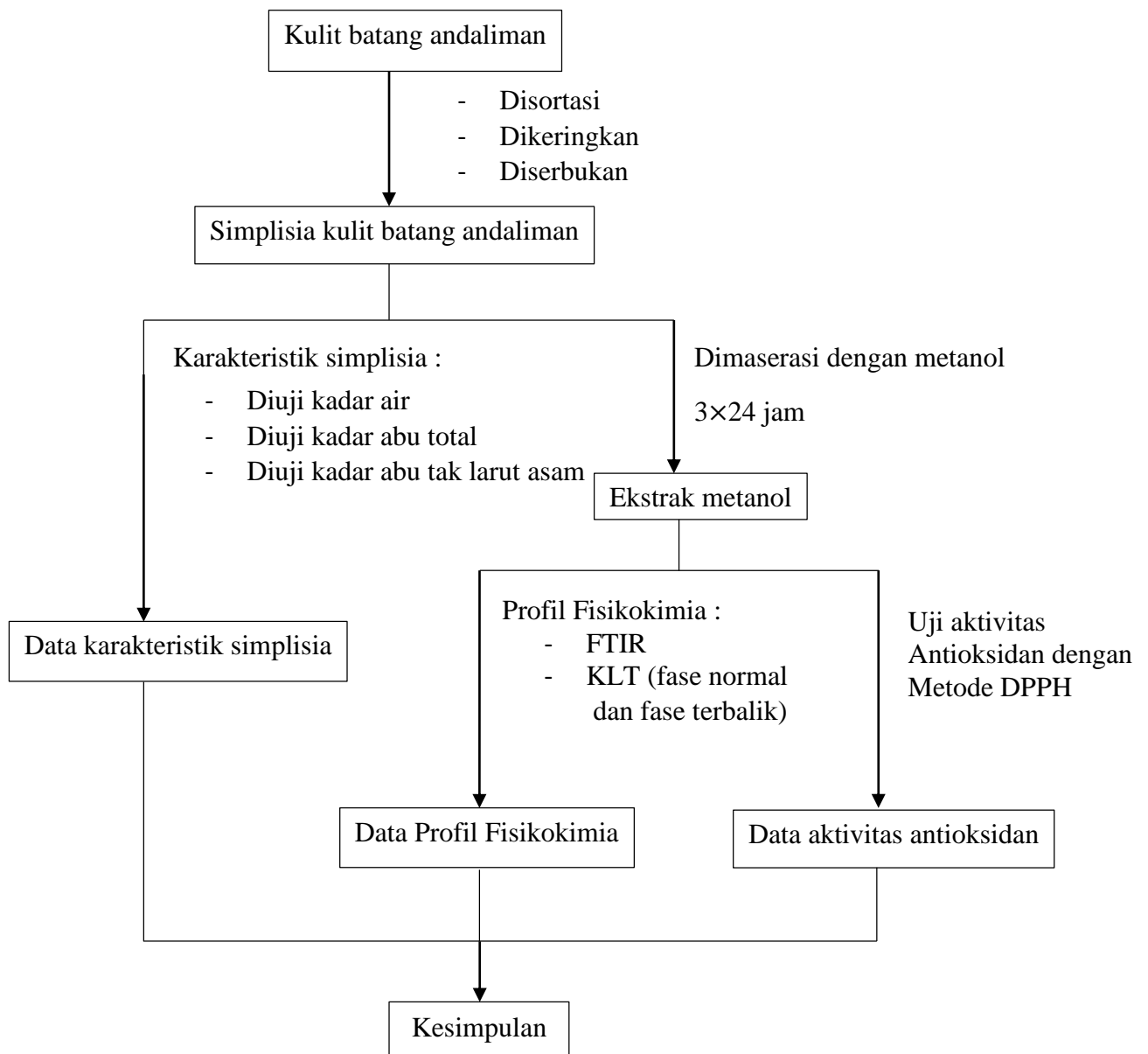
Alat-alat yang digunakan untuk karakteristik simplisia, yaitu alat-alat gelas, oven, neraca analitik, cawan krus bertutup, pembakar bunsen, *furnace*, *hotplate*, dan desikator. Peralatan yang digunakan untuk proses ekstraksi adalah corong *buchner*, *vacuum rotatory evaporator*, dan alat-alat gelas. Peralatan yang digunakan untuk profil fisikokimia adalah set alat KLT, lampu UV 254 nm, dan spektrofotometer FTIR, serta peralatan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah alat-alat gelas, dan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini, yaitu kulit batang andaliman yang berasal dari Sumatera Utara. Pada proses karakteristik simplisia, ekstraksi, dan profil fisikokimia digunakan juga aquades, metanol, n-heksana, etil asetat, asam klorida, diklorometana, dan asetonitril. Pada uji antioksidan digunakan metanol, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), dan asam askorbat.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu preparasi sampel, karakteristik simplisia, profil fisikokimia, dan uji aktivitas antioksidan dari kulit batang andaliman sesuai uraian pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Karakteristik Simplisia

Karakteristik simplisia kulit batang andaliman yang dilakukan, yaitu penentuan kadar air, kadar abu total, dan kadar abu tak larut asam.

3.3.1.1 Penentuan Kadar Air

Prosedur penentuan kadar air ini mengacu pada SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Pengujian kadar air dilakukan dengan menggunakan metode oven. Penentuan kadar air dilakukan dengan

cara menimbang simplisia kulit batang andaliman sebanyak 1-2 g pada botol timbang tertutup yang sudah diketahui bobotnya. Kemudian dikeringkan pada oven pada suhu 105°C selama 3 jam, lalu didinginkan dalam desikator. Setelah itu ditimbang dan diulangi pekerjaan hingga diperoleh bobot yang tetap.

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{W_1}{W} \times 100\%$$

W = bobot cuplikan sebelum dikeringkan (g)

W₁ = kehilangan bobot setelah dikeringkan (g)

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. Penentuan kadar abu total dilakukan dengan cara menimbang 2-3 gram simplisia kulit batang andaliman ke dalam cawan porselen (atau platina) yang telah diketahui bobotnya. Kemudian diarakkan diatas nyala pembakar dan diabukan dalam tanur listrik (furnace) pada suhu maksimum 550°C sampai pengabuan sempurna (sekali-kali pintu tanur dibuka sedikit, agar oksigen bisa masuk). Setelah itu, didinginkan dalam desikator, lalu ditimbang sampai diperoleh bobot tetap.

$$\% \text{ Kadar Abu Total} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

W = bobot contoh sebelum diabukan (g)

W₁ = bobot contoh + cawan sesudah diabukan (g)

W₂ = bobot cawan kosong (g)

3.3.1.3 Penentuan Kadar Abu Tak Larut dalam Asam

Penentuan kadar abu tak larut dalam asam dilakukan mengacu pada SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Penentuan kadar abu tak larut dalam asam dilakukan dengan cara melarutkan abu bekas penetapan kadar abu dengan penambahan 25 ml HCl 10%. Kemudian dididihkan selama 5 menit, selanjutnya larutan disaring dengan kertas saring tak berabu dan cuci dengan air suling sampai bebas klorida. Setelah itu, kertas saring diletakkan dalam cawan porselen (platina) yang sudah diketahui bobotnya dan dikeringkan dalam oven sampai menjadi abu. Kemudian cawan didinginkan

dalam desikator hingga suhu kamar, lalu ditimbang. Penimbangan diulangi hingga diperoleh bobot tetap.

$$\% \text{ Kadar Abu Tak Larut dalam Asam} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

W = bobot cuplikan (g)

W₁ = bobot cawan + abu (g)

W₂ = bobot cawan kosong (g)

3.3.2 Profil Fisikokimia

Profil fisikokimia dilakukan terhadap ekstrak metanol kulit batang andaliman. Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan 150 gram simplisia kulit batang andaliman. Ekstraksi dilakukan dengan cara ekstraksi dingin, yaitu metode maserasi. Simplisia kulit batang andaliman direndam menggunakan metanol selama 3×24 jam pada suhu ruang, pelarut diganti setiap 24 jam. Kemudian ekstrak hasil maserasi disaring menggunakan corong *Buchner*, filtratnya dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotatory evaporator* untuk menghilangkan pelarutnya, sehingga diperoleh ekstrak metanol kulit batang andaliman.

3.3.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Profil fisikokimia ekstrak metanol kulit batang andaliman dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) fase normal dan fase terbalik dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak dalam metanol dan ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada plat KLT yang sudah diberi tanda batas atas dan bawah. Lalu plat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* yang sudah berisi eluen. Eluen yang digunakan untuk fase normal, yaitu n-heksana:etil asetat (1:1), n-heksana:etil asetat (8:2), n-heksana:etil asetat (7:3), etil asetat:metanol (9:1), dan diklorometana:metanol (9:1). Sedangkan eluen yang digunakan untuk KLT fase terbalik adalah metanol 100%, metanol:air (1:1), dan metanol:asetonitril (3:7). Kemudian diamati pergerakan eluen sampai tanda batas atas. Setelah itu, hasil KLT divisualisasi menggunakan lampu UV 254 nm dan dihitung nilai R_f pada setiap noda yang terbentuk.

3.3.3 Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH, yaitu dilakukan pada asam askorbat untuk memverifikasi metode dan dilakukan juga

pada ekstrak metanol kulit batang andaliman, sesuai dengan prosedur yang digunakan oleh Brand-William, dkk. (1995) dengan sedikit modifikasi.

3.3.3.1 Uji Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat

Pengujian aktivitas antioksidan asam askorbat, dilakukan dengan cara membuat larutan asam askorbat dalam metanol dengan berbagai konsentrasi, yaitu 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm. Kemudian masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml dan dimasukkan ke dalam botol vial, setelah itu ditambahkan 2 ml larutan DPPH 60 ppm dalam metanol. Kemudian campuran di homogenkan dan diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruang dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 517 nm.

3.3.3.2 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Batang Andaliman

Pengujian pada ekstrak metanol kulit batang andaliman dilakukan dengan cara yang sama seperti pengujian pada asam askorbat, yaitu dengan membuat larutan ekstrak dalam metanol dengan berbagai konsentrasi, yaitu 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Kemudian masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml dan dimasukkan ke dalam botol vial, setelah itu ditambahkan 2 ml larutan DPPH 60 ppm dalam metanol. Kontrol yang digunakan, yaitu DPPH sebanyak 2 ml dan metanol sebanyak 4 ml. Kemudian diukur absorbansinya.

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran absorbansi pada sampel sebanyak dua kali (duplo). Kemudian hasil ini digunakan untuk menghitung persen inhibisi aktivitas radikal bebas (Q). Persen inhibisi dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

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

Keterangan: Q = Persen inhibisi aktivitas radikal bebas

A_o = Absorbansi kontrol (Pelarut + DPPH)

A_c = Absorbansi sampel (Sampel + DPPH)

Penentuan nilai IC_{50} dapat diperoleh 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* (IC₅₀)

c = Konsentrasi sampel

Nilai IC₅₀ dapat diperoleh dengan cara memasukkan nilai Y=50, serta memasukkan nilai m dan c yang diperoleh dari persamaan garis, sehingga nilai x sebagai IC₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

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