

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) yang berasal dari Sumatera Utara. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Juli 2019 di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati, Laboratorium Kimia Instrumen, dan Laboratorium Kimia Dasar Analisis Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI).

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam tahap karakteristik simplisia adalah cawan krus bertutup, spatula, oven, neraca analitik, desikator, furnace, cawan porselen, kasa, pembakar bunsen, tang krus, batang pengaduk, alat-alat gelas, corong kaca, pH meter, pipet tetes, dan *hotplate*. Pada tahap ekstraksi, peralatan yang digunakan antara lain alat-alat gelas, *vacuum rotary evaporator*, dan corong *buchner*, sedangkan tahap karakteristik fisikokimia adalah alat-alat gelas, *hotplate*, set peralatan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) seperti *chamber*, pipa kapiler, pipet tetes, dan spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) Shimadzu 8400. Sementara itu, pada pengujian aktivitas antioksidan digunakan peralatan alat-alat gelas, mikropipet, dan spektrofotometer UV-Vis.

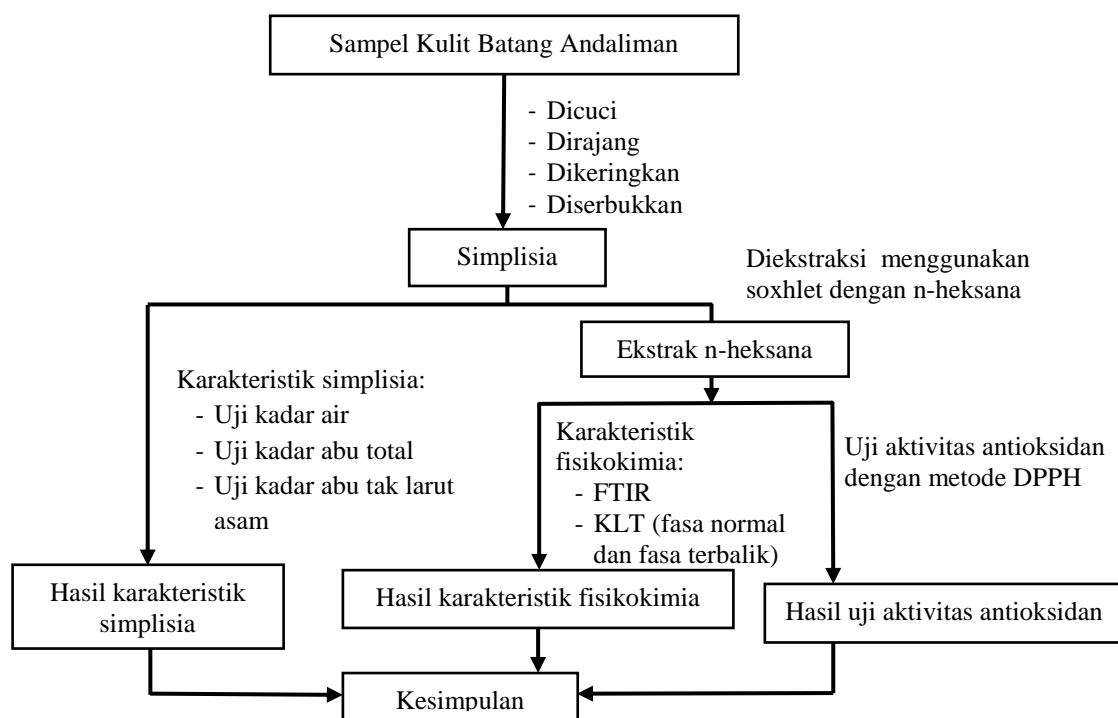
3.2.2 Bahan

Bahan utama dari penelitian ini adalah kulit batang Andaliman yang telah dipreparasi menjadi serbuk simplisia. Bahan kimia yang digunakan pada tahap karakteristik simplisia dan ekstraksi adalah n-heksana teknis yang telah dilakukan destilasi, aquades, kertas saring tak berabu (Whatman no. 40), HCl 10%, sedangkan bahan kimia yang digunakan untuk tahap karakteristik fisikokimia adalah aquades, silika gel, n-heksana, etil asetat, metanol, diklorometana, dan asetonitril. Sementara itu, bahan kimia yang digunakan dalam tahap uji aktivitas

antioksidan adalah 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), metanol, dan asam askorbat.

3.3 Prosedur Penelitian

Secara umum, tahapan yang dilakukan dari penelitian ini ditunjukkan pada bagan alir gambar 3.1. Penelitian dimulai dengan mengubah sampel kulit batang andaliman menjadi simplisia. Selanjutnya, dilakukan karakteristik melalui beberapa parameter uji seperti kadar air, kadar abu total, dan kadar abu tak larut asam. Simplisia juga diekstrak dengan pelarut n-heksana menggunakan metode soxhlet dan dilanjutkan dengan karakteristik fisikokimia (identifikasi gugus fungsi dan jumlah komponen) serta uji aktivitas antioksidan.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Karakteristik Simplisia

Karakteristik simplisia yang dilakukan terhadap simplisia kulit batang andaliman meliputi beberapa serangkaian pengujian, seperti penentuan kadar air, penentuan kadar abu total dan penentuan kadar abu tak larut asam.

3.3.1.1 Penentuan Kadar Air

Dalam melakukan penentuan kadar air digunakan prosedur yang mengacu terhadap SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Prosedur ini dilakukan dengan metode oven. Botol timbang bertutup ditimbang terlebih dahulu, lalu simplisia kulit batang andaliman (cuplikan) ditimbang 1-2 g pada botol timbang bertutup yang telah diketahui bobotnya. Selanjutnya, dikeringkan selama 3 jam dengan oven pada suhu 105°C, lalu didinginkan dalam desikator. Kemudian ditimbang dan diulangi hingga diperoleh bobot yang konstan.

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

Keterangan:

W = bobot cuplikan sebelum dikeringkan (g)

W₁ = kehilangan bobot setelah dikeringkan (g)

3.3.1.2 Penentuan Kadar Abu Total

Dalam menentukan kadar abu total digunakan prosedur yang mengacu terhadap SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Cawan porselen ditimbang terlebih dahulu, lalu simplisia kulit batang andaliman (cuplikan) ditimbang 2-3 g pada cawan porselen yang telah diketahui bobotnya. Selanjutnya, diarakkan di atas kasa yang telah dipasang pada pembakar, dan diabukan pada suhu 550°C dengan furnace hingga pengabuan sempurna. Lalu, didinginkan dalam desikator. Setelah itu, ditimbang dan diulangi hingga diperoleh bobot yang konstan.

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

Keterangan:

W = bobot cuplikan sebelum diabukan (g)

W₁ = bobot contoh + cawan sesudah diabukan (g)

W₂ = bobot cawan kosong (g)

3.3.1.3 Penentuan Kadar Abu Tak Larut Asam

Dalam melakukan penentuan kadar abu tak larut asam digunakan prosedur yang mengacu pada SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Pada proses ini digunakan abu pada saat penentuan kadar abu total. Pertama, abu

dilarutkan dengan 25 mL HCl 10%. Kemudian, dididihkan selama 5 menit. Selanjutnya, disaring menggunakan kertas saring tak berabu dan dicuci dengan air suling hingga bebas klorida. Lalu, diletakkan ke dalam cawan porselen yang telah diketahui bobotnya dan dikeringkan pada oven hingga menjadi abu. Cawan didinginkan dalam desikator hingga suhu kamar. Setelah itu, ditimbang dan diulangi hingga diperoleh bobot yang konstan.

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

Keterangan:

- W = bobot cuplikan (g)
 W₁ = bobot cawan + abu (g)
 W₂ = bobot cawan kosong (g)

3.3.2 Karakteristik Fisikokimia

Simplisia kulit batang andaliman (sampel) diekstrak terlebih dahulu dengan pelarut n-heksana dan hasil ekstraksi dilanjutkan dengan identifikasi gugus fungsi menggunakan *Fourier Transform Infra Red* dan penentuan jumlah komponen menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. Pada sampel dilakukan proses pengeringan terlebih dahulu, lalu diserbukkan menjadi bentuk simplisia dan dilanjutkan tahap ekstraksi pada simplisia kulit batang andaliman menggunakan metode soxhlet. Sampel dimasukkan ke dalam kertas saring dan dibuat menjadi 3 timbel, dengan masing-masing timbel berisi sampel sebanyak 50 gram. Selanjutnya, timbel diekstraksi dengan pelarut n-heksana sebanyak ±700 mL. Setiap timbel diekstraksi selama 3x12 jam. Ekstrak hasil soxhletasi disaring menggunakan corong buchner dan filtratnya dipisahkan dari pelarut menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Sehingga, hasil akhir akan diperoleh ekstrak n-heksana kulit batang andaliman.

3.3.3 Kromatografi Lapis Tipis

Penentuan jumlah komponen pada ekstrak n-heksana kulit batang andaliman dilakukan dengan KLT menggunakan fasa normal dan fasa terbalik. Adapun beberapa perbandingan eluen yang digunakan, antara lain: 1)Fasa Normal, n-heksana:etil asetat (7:3); n-heksana:etil asetat (8:2); n-heksana:etil asetat (1:1); etil

asetat:metanol (9:1); diklorometana:metanol (9:1); dan 2)Fasa Terbalik, Metanol 100%; Metanol:Asetonitril (1:1); Metanol:Air (1:1).

Dalam praktiknya, baik fasa terbalik maupun fasa normal prosedur yang dilakukan tetap sama. Ekstrak dilarutkan dalam n-heksana, kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada plat KLT berukuran 5 cm x 1 cm yang sebelumnya sudah diberi tanda batas bawah dan batas atas. Lalu, dimasukkan dalam *chamber* tertutup yang berisi beberapa eluen dengan berbagai perbandingan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Sebelum plat dimasukkan ke dalam *chamber*, perlu dipastikan bahwa *chamber* telah dijenuhkan dengan kertas saring hingga kertas saring terelusi seluruhnya oleh eluen. Selanjutnya, plat KLT dimasukkan dalam posisi berdiri. Setelah itu divisualisasi dengan sinar UV 254 nm untuk diamati berapa banyak noda yang terpisah pada plat. Lalu dihitung nilai Rf untuk masing-masing noda.

3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan

Dalam menguji aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana kulit batang andaliman (sampel) dilakukan menggunakan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dengan asam askorbat sebagai kontrol positif. Metode yang digunakan sesuai dengan yang dilakukan oleh Brand-William, dkk. (1995) dengan modifikasi. Tahap uji diawali dengan membuat larutan asam askorbat dalam metanol dengan berbagai konsentrasi, antara lain 2,4,6,8, dan 10 ppm. Larutan asam askorbat dipipet sebanyak 4 mL ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH 40 ppm dalam metanol. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm.

Sedangkan, untuk uji aktivitas larutan sampel prosedurnya masih sama. Namun, konsentrasi yang digunakan berbeda antara lain 20,40,60,80, dan 100 ppm begitu pula konsentrasi DPPH yakni menjadi 60 ppm. Tahap uji diawali dengan membuat larutan asam askorbat dalam metanol dengan berbagai konsentrasi, antara lain 20,40,60,80, dan 100 ppm. Larutan sampel dipipet sebanyak 4 mL ke dalam 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 dilakukan secara triplo baik dalam menguji asam askorbat maupun sampel. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Hasil absorbansi digunakan untuk menghitung persen inhibisi aktivitas radikal bebas (Q). Persen inhibisi dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

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

Keterangan:

- Q = Persen inhibisi aktivitas radikal bebas
- A_o = Absorbansi kontrol (pelarut + DPPH)
- A_c = Absorbansi sampel (sampel + DPPH)

Dari nilai persen inhibisi dapat ditentukan nilai IC₅₀ 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

Sehingga, nilai IC₅₀ dapat diperoleh dengan dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

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