

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

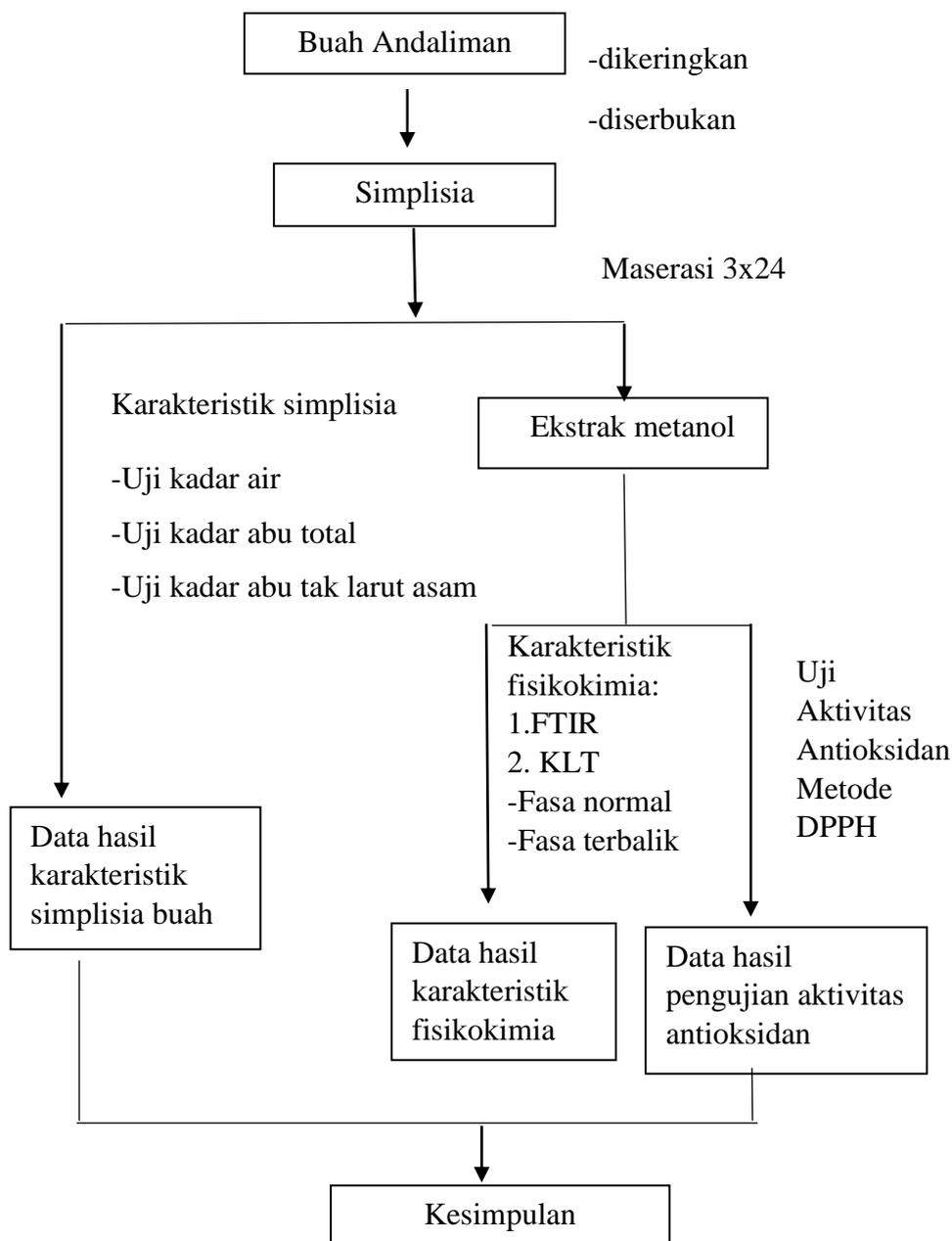
Peralatan yang digunakan pada tahap uji kadar air, kadar abu total, dan kadar abu tak larut adalah alat-alat gelas, oven, neraca analitik, cawan krus bertutup, pembakar Bunsen, furnace, *hotplate*, desikator, Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi adalah alat-alat gelas, penguap putar bervakum (*rotatory evaporator*), dan corong Buchner. Peralatan yang digunakan pada tahap karakteristik fisikokimia adalah alat – alat gelas, set peralatan KLT, dan spektrofotometer FTIR untuk analisis gugus fungsi. Peralatan yang digunakan tahap uji aktivitas antioksidan adalah alat– alat gelas dan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah andaliman yang telah dipreparasi menjadi serbuk simplisia. Bahan kimia yang digunakan pada tahap uji kadar air, kadar abu total, kadar abu tak tak larut asam, dan ekstraksi adalah metanol teknis yang telah didestilasi, aquades, dan kertas saring tak berabu (Whatman no.40). Bahan kimia yang digunakan untuk pengujian karakteristik fisikokimia adalah aquades, metanol, n-heksan, etil asetat, dan diklorometan. Bahan kimia yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah DPPH (2, 2 – *diphenyl-1-picrylhydrazyl*), metanol teknis yang telah didestilasi, dan asam askorbat.

3.3 Prosedur Penelitian

Secara umum tahapan yang dilakukan pada penelitian ini meliputi tahap preparasi sampel, ekstraksi menggunakan metode maserasi, kemudian karakteristik simplisia yang meliputi uji kadar air, uji kadar abu total, dan uji kadar abu tak larut asam. Karakteristik fisikokimia diketahui berdasarkan analisis FTIR dan KLT, serta uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Tahapan penelitian tersebut disajikan dalam bagan alir pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Karakteristik Simplisia

Pengujian karakteristik simplisia dilakukan dengan menentukan kadar air, kadar abu total, dan kadar abu tak larut asam.

3.3.1.1 Penentuan Kadar Air

Penentuan kadar air yang dilakukan mengacu pada prosedur SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman dengan metode oven. Simplisia buah andaliman ditimbang sebanyak 1- 2 gram pada botol timbang tertutup 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 tetap.

$$\% \text{Kadar air} = \frac{w}{w_1} \times 100\%$$

w = bobot cuplikan sebelum dikeringkan (g)

w₁ = kehilangan bobot setelah dikeringkan (g)

3.3.1.2 Penentuan Kadar Abu Total

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

$$\% \text{Kadar Abu Total} = \frac{w_1 - w_2}{w} \times 100\%$$

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 Asam

Penentuan kadar abu tak larut asam dilakuakn mengacu pada prosedur SNI 01- 2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Miuman. 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 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.

$$\% \text{Kadar Abu Tak Larut Asam} = \frac{w_1 - w_2}{w} \times 100\%$$

w = bobot cuplikan (g)

w_1 = bobot cawan + abu (g)

w_2 = bobot cawan kosong (g)

3.3.2 Karakteristik Fisikokimia

Pengujian karakteristik fisikokimia dilakukan pada ekstrak metanol buah andaliman. Proses ekstraksi dilakukan pada sampel buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) yang sudah dicuci, dikeringkan, dan diserbukan sehingga diperoleh simplisia. Sebanyak 200 g simplisia diekstraksi dengan pelarut metanol sebanyak 1,6 L. Teknik ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Sampel buah andaliman direndam dalam pelarut metanol selama 3x24 jam pada suhu ruang kemudian pelarut diganti setiap 24 jam. Ekstrak hasil maserasi disaring menggunakan Buchner dan filtratnya dipekatkan menggunakan *vacuum rotatory evaporator*

3.3.2.1 Kromatografi Lapis Tipis

Untuk mengetahui karakteristik fisikokimia pada ekstrak metanol buah andaliman dilakukan analisis dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis. Pada metode ini digunakan KLT fasa normal (*normal phase*) dan KLT fasa terbalik (*reverse phase*) menggunakan campuran eluen beberapa perbandingan.

3.3.2.1.1 KLT Fasa Normal

Ekstrak kental buah andaliman dilarutkan dalam metanol, kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada plat KLT berukuran 1cm x 5cm yang

sudah diberi tanda batas bawah dan batas atas. Setelah itu plat dimasukkan ke dalam chamber berisi eluen dengan posisi berdiri. Chamber dijenuhkan terlebih dahulu dengan memasukkan kertas saring hingga terelusi seluruhnya oleh eluen. Campuran eluen yang digunakan adalah n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 1:1, 8:2, dan 7:3, diklorometan:metanol 9:1, serta etil asetat:metanol 9:1. Setelah itu plat KLT divisualisasikan di bawah sinar UV 254 nm untuk mendeteksi pemisahan noda pada plat. Setelah itu dihitung nilai Rf dari masing-masing noda.

3.3.2.1.2 KLT Fasa Terbalik

Ekstrak kental buah andaliman dilarutkan dalam metanol, kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada plat KLT berukuran 1cm x 5cm yang sudah diberi tanda batas bawah dan batas atas. Setelah itu plat dimasukkan ke dalam chamber berisi eluen dengan posisi berdiri. Chamber dijenuhkan terlebih dahulu dengan memasukkan kertas saring hingga terelusi seluruhnya oleh eluen. Campuran eluen yang digunakan adalah asetonitril:metanol dengan perbandingan dan 7:3, metanol:air 1:1 dan metanol 100%. Kemudian plat KLT divisualisasikan di bawah sinar UV 254 nm untuk mendeteksi pemisahan noda pada plat. Setelah itu dihitung nilai Rf dari masing-masing noda.

3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol buah andaliman dilakukan menggunakan metode DPPH dan asam askorbat. Pengujian dilakukan dengan cara membuat larutan asam askorbat dengan metanol dengan berbagai konsentrasi yaitu (2,4,6,8, dan 10) ppm dan larutan DPPH dalam metanol 60 ppm. Sebanyak 4 ml larutan asam askorbat berbagai konsentrasi dipipet ke dalam vial berisi 2 ml larutan DPPH 60 ppm. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian ekstrak metanol buah andaliman diperlakukan sama seperti asam askorbat dengan cara membuat larutan ekstrak dalam metanol dengan berbagai konsentrasi yaitu (5,10,15, dan 25) ppm. Sebanyak 4 ml larutan ekstrak buah andaliman berbagai konsentrasi dipipet ke dalam vial berisi 2 ml larutan DPPH 60 ppm Pengukuran absorbansi

pengujian ini dilakukan sebanyak dua kali (duplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung persen inhibisi radikal bebas.

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 menggunakan persamaan sebagai berikut:

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