

## **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 daerah Sumatera Utara. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Juli 2019 di Laboratorim Riset Kimia Material dan Hayati, Laboratorium Kimia Instrumen, Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia, Laboratorium Kimia Dasar Analisis Departemen Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) Bandung. Proses analisis FTIR (*Fourier Transform InfraRed*) dilakukan di Universitas Garut (UNIGA).

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat**

Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi adalah alat-alat gelas, penguap putar bervakum (*vacum rotatory evaporator*) dan corong *buchner*. Peralatan yang digunakan pada tahap karakterisasi fisikokimia (KLT dan FTIR) adalah alat-alat gelas, *hot plate*, set peralatan KLT, dan spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) untuk analisis gugus fungsi. Peralatan yang digunakan pada tahap uji aktivitas antioksidan adalah alat-alat gelas, pipet ukur, *ball pipet*, *hot plate* dan spektrofotometer UV-Vis.

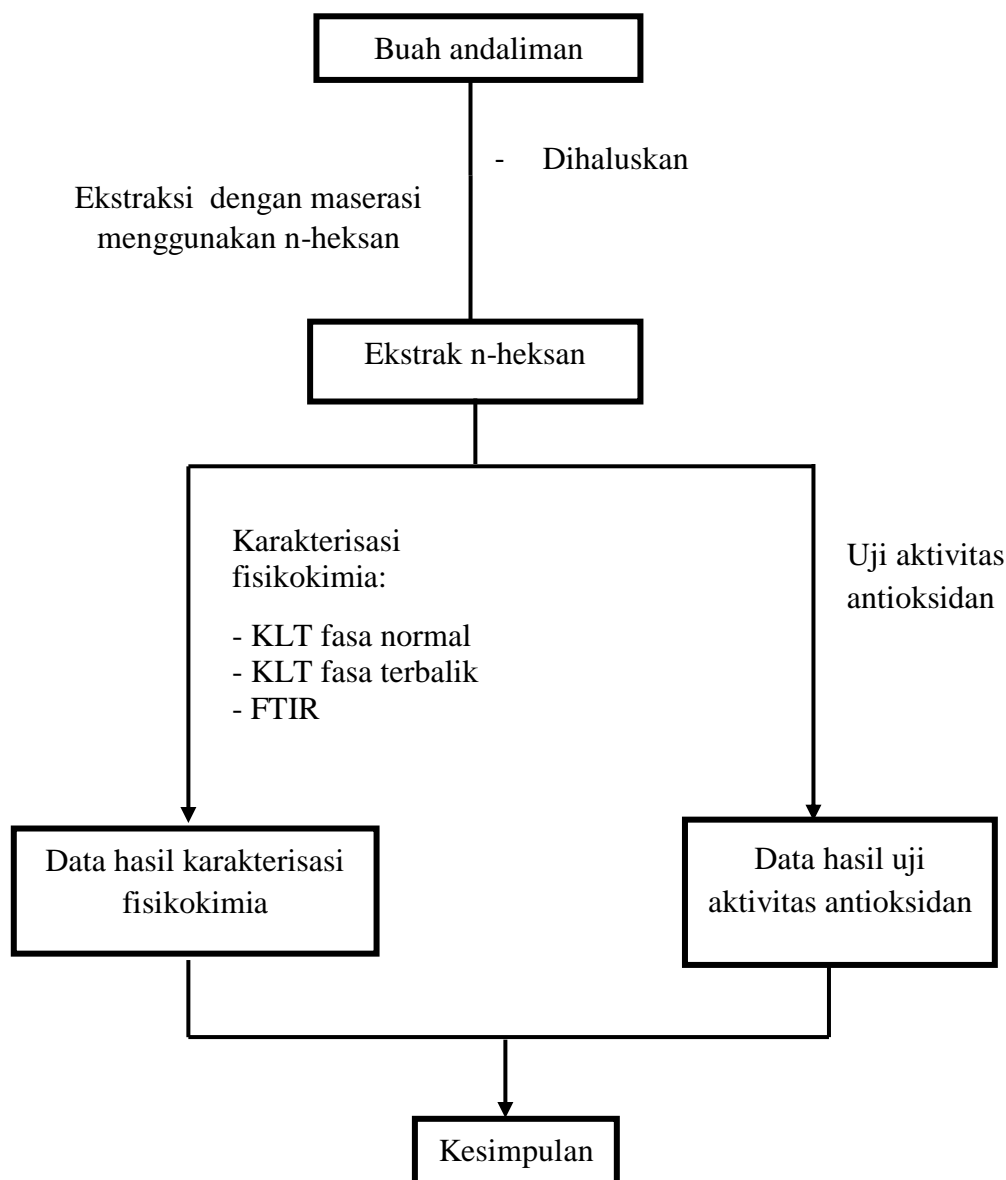
##### **3.2.2 Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah andaliman segar. Ekstraksi menggunakan pelarut n-heksan teknis yang sudah didestilasi. Bahan kimia yang digunakan pada tahap karakterisasi fisikokimia (KLT fasa normal, fasa terbalik, dan FTIR) adalah ekstrak n-heksan buah andaliman; aquades; n-heksan teknis yang sudah didestilasi; etil asetat; diklorometan; asetonitril.

Bahan kimia yang digunakan pada tahap uji aktivitas antioksidan adalah DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil); metanol teknis yang telah didestilasi; ekstrak n-heksan buah andaliman dan asam askorbat.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini secara umum disajikan dalam bagan alir pada Gambar 3.1.



**Gambar 3. 1** Bagan alir penelitian

### 3.3.1 Analisis Fisikokimia

Analisis fisikokimia dilakukan terhadap buah andaliman segar dan analisis lanjutan dilakukan pada ekstrak n-heksan buah andaliman. Proses ekstraksi dilakukan pada sampel buah andaliman segar yang diserbukkan sebanyak 450 gram, diekstraksi cara dingin yaitu maserasi dengan pelarut n-heksan sebanyak 2,5 liter. Sampel diekstrak dengan pelarut n-heksan selama 3x24 jam. Hasil maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak yang pekat.

#### 3.3.1.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

##### a. KLT Fasa Normal

Analisis komponen senyawa pada ekstrak n-heksan buah andaliman dengan KLT fasa normal dilakukan menggunakan eluen n-heksan, etil asetat, diklorometan, dan metanol. Ekstrak dilarutkan dalam n-heksan, kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada plat KLT berukuran 5 cm x 1 cm yang sudah diberi tanda batas bawah dan batas atas. Kemudian plat dimasukkan dalam *chamber* tertutup dengan posisi berdiri dan lurus yang sudah diberi campuran eluen n-heksan:etil asetat dengan perbandingan berturut-turut 1:1, 8:2, dan 7:3, eluen diklorometan:metanol dan eluen etil asetat:metanol dengan perbandingan 9:1. *Chamber* sebelumnya telah dijenuhkan dengan cara memasukan kertas saring hingga kertas saring terelusi seluruhnya oleh eluen. Setelah itu dilihat dengan sinar UV 254 nm untuk diamati banyaknya noda yang terpisah pada plat. Lalu dihitung nilai R<sub>f</sub>nya untuk masing-masing noda.

##### b. KLT Fasa Terbalik

Analisis komponen senyawa pada ekstrak n-heksan buah andaliman dengan KLT fasa terbalik sama seperti yang sebelumnya dilakukan pada KLT dengan fasa normal, hanya eluen yang digunakan berbeda. Eluen yang digunakan adalah n-heksan, asetonitril, metanol, dan aquades. Ekstrak dilarutkan dalam n-heksan, kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada plat KLT berukuran 5 cm x 1 cm yang sudah diberi tanda batas bawah

dan batas atas. Kemudian plat dimasukkan dalam chamber tertutup dengan posisi berdiri dan lurus yang sudah diberi campuran eluen metanol:asetonitril (1;1), metanol:air (1:1), metanol:air (8:2), metanol 100%, dan metanol:air (2:8). *Chamber* sebelumnya telah dijenuhkan dengan cara memasukan kertas saring hingga kertas saring terelusi seluruhnya oleh eluen. Setelah itu dilihat dengan sinar UV 254 nm untuk diamati banyaknya noda yang terpisah pada plat. Lalu dihitung nilai Rfnya untuk masing-masing noda.

### 3.3.2 Uji Aktivitas Antioksidan

#### a. Uji aktivitas antioksidan pada asam askorbat

Pengujian dimulai dengan cara membuat larutan asam askorbat dalam metanol dengan berbagai konsentrasi yaitu (2,4,6,8 dan 10) ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 60 ppm dalam metanol. Campuran dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Kontrol yang digunakan yaitu campuran dari 2 ml DPPH dan 4 ml metanol sedangkan blanko yang digunakan yaitu metanol.

#### b. Uji aktivitas antioksidan pada ekstrak

Pengujian ekstrak n-heksan buah andaliman dilakukan sama seperti asam askorbat, dengan cara melarutkan ekstrak dalam metanol dengan dipanaskan dan diaduk hingga ekstrak larut semua. Larutan ekstrak dalam metanol dibuat dengan berbagai konsentrasi (20,40,60,80 dan 100 ppm). Masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 60 ppm dalam metanol. Kontrol yang digunakan yaitu campuran dari 2 ml DPPH dan 4 ml metanol sedangkan blanko yang digunakan yaitu metanol.

Pengukuran absorbansi tiap konsentrasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) yang selanjutnya 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<sub>o</sub> = Absorbansi control (pelarut + DPPH)

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

Untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub>)

c = Konsentrasi sampel

Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh dengan memasukkan nilai Y=50 serta nilai m dan c yang diperoleh dari persamaan garis, sehingga nilai x sebagai IC<sub>50</sub> dapat dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut

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