BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan. Waktu penelitian dimulai dari bulan Februari 2018 sampai bulan Juni 2018. Lokasi penelitian dilakukan di berbagai tempat, antara lain:

- Laboratorium Riset Kimia Hayati Gedung B Lantai 4 FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, dilakukan proses destilasi pelarut.
- Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, dilakukan proses pemisahan dan pemurnian senyawa metil piperat dari ekstrak metanol buah cabe jawa.
- 3. Laboratorium Kimia Organik, Insitut Teknologi Bandung dilakukan proses karakterisasi senyawa yaitu pengujian spektroskopi NMR ¹H.
- 4. Laboratorium Kimia Instrumen, FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia dilakukan proses identifikasi gugus fungsi senyawa menggunakan spektroskopi inframerah dan uji aktivitas antioksidan.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Pada penelitian ini akan digunakan beberapa peralatan, antara lain: alat-alat gelas, *vacuum rotary evaporator*, *freeze dryer*, *magnetic stirer&hotplate*, set alat KLT, lampu UV 254 nm, set alat kromatografi cairvakum dengan kolom berdiameter 7 cm untuk proses pemisahan dan pemurnian senyawa, set alat kromatotron pada kromatografi radial untuk pemurnian senyawa. Pada proses karakterisasi senyawa digunakan: set instrumen FTIR Thermoficher Scientific untuk idetifikasi gugus fungsi senyawa dan set instrumenNMR Allegient 500 MHz dengan Konsol DD₂ pada frekuensi 500 MHz untuk ¹H untuk karakterisasi struktur senyawa

Jilan Izdihar Fauziyyah, 2018

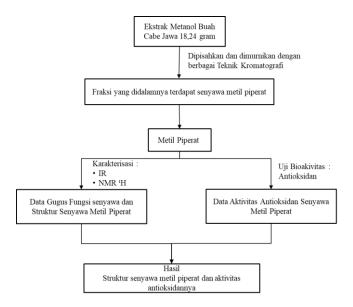
metil piperat, dan digunakan pula spektroskopi UV-Vis Instrumen UVmini-1240 SHIMADZU untuk set uji aktivitas antioksidan.

3.2.2. Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol dari buah Cabe Jawa asal Jawa Barat. Selain itu digunakan pula berbagai macam pelarut organik seperti metanol, n-heksana, etil asetat, aseton, dan diklorometan. Pada proses pemisahan dan pemurnian digunakan berbagai jenis silika gel, antara lain silika gel Merck 60 (70-230 mesh) untuk kromatografi kolom, untuk kromatografi lapis tipis digunakan plat KLT silka gel 60 GF254 dengan ketebalan 0,25 mm. Digunakan pula DPPH dan asam askorbat untuk uji aktivitas antioksidan.

3.3. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dimulai dari preparasi sampel, proses isolasi dan pemurnian senyawa, proses karakterisasi meliputi penentuan gugus fungsi senyawa menggunakan spektroskopi inframerah dan penentuan struktur senyawa menggunakan spektroskopi NMR 1H, uji aktivitas antioksidan sampai diperoleh hasil berupa senyawa metil piperat hasil isolasi dan aktivitas antioksidan dari senyawa tersebut. Untuk prosedur penelitian bisa dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan alir prosedur penelitian

3.3.1. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa

Sebanyak 18,24 gram ekstrak metanol buah cabe cabe diisolasi menggunakan teknik Kromatografi Cair Vakum (KVC) dengan eluen n-Heksan:Etil Asetat pada yang dinaikan secara gradien, yaitu n-Heksan 100% 3x 100 mL, n-Heksan:Etil Asetat 9,5:0,5 5x 100 mL, n-Heksan:Etil Asetat 9:1 4x 100 mL, n-Heksan:Etil Asetat 8,5:1,5 4x 100 mL, etil asetat 100% 2x 100 mL dan metanol 100% 2x 100 mL. hasil KVC diperoleh 20 fraksi yang kemudian di KLT untuk melihat profil senyawa yang berhasil dipisahkan. noda-noda yang mirip digabungkan sehingga diperoleh 4 fraksi campuran yaitu fraksi A (fraksi 1-5), fraksi B (fraksi 6-12), fraksi C (fraksi 13-17), dan fraksi D (fraksi 18-20). Keempat fraksi di KLT ulang dibandingkan dengan metil piperat. Fraksi B memiliki noda yang mirip dengan standar metil piperat

akan tetapi masih bergabung dengan noda lain. Dilakukan proses pemurnian pada fraksi B menggunakan teknik kromatografi Cair Vakum (KVC) dengan eluen, n-Heksan:Etil Asetat9:1 11x 100 mL dan metanol 100% 1x 100 mL. Hasil KVC kedua diperoleh 12 fraksi yang kemudian di KLT untuk melihat profil noda yang mirip. Diperoleh 3 fraksi terpisah yaitu fraksi B.1 (fraksi 1), B.2 (fraksi 2-5) B.3 (fraksi 6-12).

Fraksi B.2 memiliki noda yang mirip dengan standar senyawa metil piperat akan tetapi masih belum murni. Fraksi B.2 dimurnikan kembali menggunakan metode kromatografi radial dengan eluen n-Heksan:Etil Asetat 9,5:0,5 5x 50 mL, n-heksan: etil asetat 8,5:1,5 1x 30 mL dan metanol 100% 1x 50 mL. Hasil dari kromatografi radial diperoleh 10 fraksi yang kemudian di KLT dan dibandingan dengan senyawa standar senyawa metil piperat. Fraksi-fraksi yang memiliki noda vang digabungkan. Diperoleh 4 fraksi gabungan yaitu fraksi B.2.1 (fraksi 1-2), B.2.2 (fraksi 3-6), B.2.3 (fraksi 7-8), dan B.2.4 (fraksi 9-10). Fraksi B.2.2 memiliki noda yang mirip dengan senyawa metil piperat. Diduga senyawa B.2.2 merupakan senyawa metil piperat. Senyawa B.2.2 selanjutnya dikarakterisasi untuk dibuktikan bahwa senyawa yang diisolasi merupakan senyawa metil piperat.

3.3.2. Identifikasi Senyawa

Untuk diyakinkan bahwa senyawa yang berhasil diisolasi merupakan senyawa metil piperat maka dilakukan karakterisasi senyawa yang meliputi penentuan gugus fungsi senyawa menggunakan spektroskopi Inframerah (FTIR) dan penentuan struktur menggunakan spektroskopi NMR ¹H.Sehingga diperoleh data sifat fisik gugus fungsi dari senyawa metil piperat dan struktur senyawa metil piperat.

3.3.3. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH radikal bebas. Prosedur pengujian menggunakan metode yang digunakan oleh brand william dkk pada tahun 1995 dengan sedikit

Jilan Izdihar Fauziyyah, 2018

modifikasi. Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

3.3.3.1. Uji Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat

Pengujian dimulai dengan cara membuat larutan asam askorbat dengan berbagai konsentrasi yaitu 2, 3, 5, dan 8 ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 mL kedalam botol vial yang ditutupi alumuniun voil. Kemudian ditambahkan larutan DPPH 40 ppm dalam metanol sebanyak 2 mL. campuran dikocok hingga homogan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm.

Pengukuran absorbansi sampel pada penelitian ini dilakukan sebanyak 2 kali pegukuran (duplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung %Inhibisi aktivitas radikal bebas (Q). persen Inhibis dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$Q = 100 \left(\frac{Ao - Ac}{Ao} \right) \times 100\%$$

Keterangan: Q = persen Inhibis aktivitas radikal bebas Ao = Absorbansi Kontrol (Pelarut + DPPH) Ac = Absorbansi Sampel (Sampel + DPPH)

Kemudian untuk menentukan nilai IC50 sampel dilakuakn dengan cara memplot %inhibisi aktivitas radikal bebas terhadap konsentrasi sampel sehingga diperoleh suatu persamaan regresi sebagai berikut:

Y=mx+c Keterangan : Y = Persen Inhibisi M=Slope $X=\mathit{Intercept}\ (IC_{50})$ C=konsentrasi sampel

Nilai IC_{50} diperoleh dengan memasukan 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:

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

Setelah diperoleh nilai IC₅₀, nilai tersebut kemudian dibandingkan ke dalam tabel kategori aktivitas antioksidan, agar diketahui tingkat nilai aktivitas antioksidan dari senyawa yang diuji. Berikut tabel kategori aktivitas antioksidan ditunjukan pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Kategori Aktivitas Antioksidan (Kamto dkk., 2014).

Rentang Nilai IC50	Kategori Aktivitas Antioksidan
IC50 < 50 ppm	Sangat kuat
50 ppm < IC50 < 100 ppm	Kuat
100 ppm < IC50 < 200 ppm	Menengah
IC50 > 200 ppm	Lemah

3.3.3.2. Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Metil Piperat

Pada pengujian senyawa metil piperat diperlakukan sama seperti asam askorbat, dengan cara membuat larutan metil piperat 10 ppm kemudian larutan tersebut diencerkan untuk diperoleh larutan berbagai konsentrasi yaitu 2, 4, 6, dan 8 ppm, tetapi pada saat pembuatan konsentrasi larutan, metil piperat dilarutkan dengan metanol sambil dipanaskan pada suhu 70°C sampai larut. Kemudian larutan tersebut masing-masing dipipet 4 ml kedalam botol vial yang ditutupi alumunium voil, kemudian ditambahkan larutan DPPH 40 ppm dalam metanol sebanyak 2 mL. Campuran tersebut kemudian di inkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya larutan

Jilan Izdihar Fauziyyah, 2018

diukur dengan spektroskopi uv-VIS pada panjang gelombang 517 nm. Kontrol yang digunakan yaitu DPPH sebanyak 2 mL dan metanol sebanyak 4 mL.

Pengukuran absorbansi sampel pada penelitian ini dilakukan sebanyak 2 kali pegukuran (duplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung % Inhibisi aktivitas radikal bebas (Q). persen Inhibis dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$Q = 100 \left(\frac{Ao - Ac}{Ao} \right) \times 100\%$$

Keterangan: Q = persen Inhibis aktivitas radikal bebas Ao = Absorbansi Kontrol (Pelarut + DPPH) Ac = Absorbansi Sampel (Sampel + DPPH)

Kemudian untuk menentukan nilai IC₅₀ sampel dilakukan dengan cara memplot %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 Ic50 diperoleh dengan memasukan 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:

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

Setelah diperoleh nilai IC_{50} , nilai tersebut kemudian dibandingkan ke dalam tabel kategori aktivitas antioksidan, agar diketahui tingkat nilai aktivitas antioksidan dari senyawa yang diuji. berikut tabel kategori aktivitas antioksidan ditunjukan pada tabel 3.1