

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan selama 5 bulan. Waktu penelitian dimulai dari bulan Februari 2018 sampai Juni 2018. Lokasi penelitian dilakukan di berbagai tempat, antara lain

- a. Proses preparasi sampel, pemisahan dan pemurnian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.
- b. Proses karakterisasi yaitu pengujian spektroskopi IR dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia dan pengujian spektroskopi ^1H NMR, dilakukan di Institut Teknologi Bandung.
- c. Uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat

Dalam penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas, labu ukur, mikro pipet, botol vial, neraca analitik, set peralatan destilasi, corong buchner, *vacuum rotatory evaporator*, set peralatan *freeze dryer*, set peralatan *melting point block*, set peralatan kromatografi vakum cair (KVC) dengan kolom berdiameter 7 cm, set peralatan kromatografi lapis tipis (KLT), set peralatan kromatografi radial, set instrumen *Infra Red* (IR) yaitu FTIR SHIMADZU 8400, lampu UV 254 nm, set instrumen NMR 1D yaitu NMR AGILENT 500 MHz (^1H NMR) dan set instrumen UV-Vis.

Ruth Natalia Pangaribuan, 2018

ISOLASI, KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA PIPERIN DARI EKSTRAK METANOL BUAH CABE JAWA (Piper retrofractum) ASAL JAWA BARAT

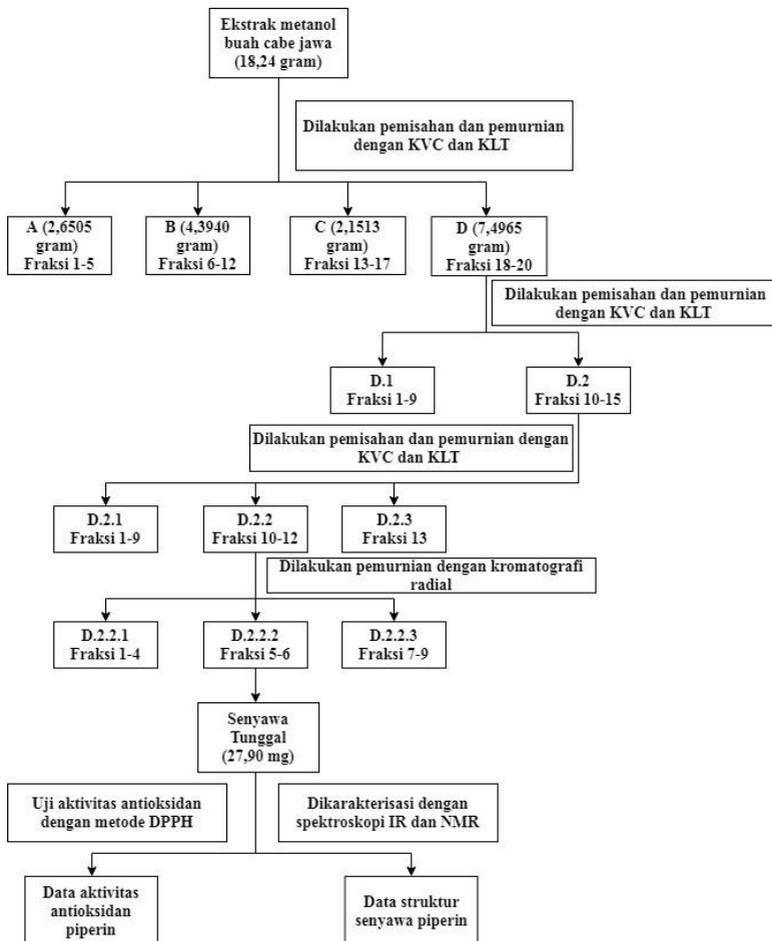
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.2.2. Bahan

Sampel yang digunakan berupa ekstrak metanol dari buah *P. retrofractum* (cabe jawa). Sedangkan bahan kimia yang digunakan antara lain berbagai pelarut organik meliputi metanol, n-heksana, dan etil asetat yang diperoleh dalam grade teknis (yang kemudian dilakukan destilasi), serta aseton, metanol dan kloroform yang diperoleh dalam grade pro analis (p.a), aquades, kertas saring. Pada proses pemisahan dan pemurnian digunakan berbagai jenis silika gel, antara lain silika gel Merck 60 (70-230 mesh) untuk kromatografi kolom dan untuk kromatografi lapis tipis digunakan plat KLT silika gel 60 GF254 dengan ketebalan 0,25 mm. Untuk uji aktivitas antioksidan digunakan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) dan antioksidan sintetik (asam askorbat) sebagai kontrol positif.

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu preparasi sampel, pemisahan dan pemurnian, karakterisasi senyawa piperin dengan metode spektroskopi dan uji aktivitas antioksidan dan antibakteri piperin. Tahapan penelitian ditunjukkan dalam bagan alir pada gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1. Preparasi Sampel

Ekstrak metanol *P. retrofractum* (cabe jawa) dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator*, kemudian diperoleh ekstrak metanol hasil evaporasi dan ditimbang massanya. Ekstrak yang diperoleh dilarutkan dalam aseton dan diimpregnasi ke dalam silika untuk dilakukan pemisahan.

3.3.2. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Piperin

Pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan metode kromatografi yaitu KLT, KVC dan kromatografi radial. Sebelum dilakukan pemisahan, KLT dilakukan terlebih dahulu untuk menentukan eluen mana yang cocok untuk digunakan dalam tahap pemisahan dengan KVC. Pemisahan dengan KVC dilakukan dengan menggunakan kolom berdiameter 7 cm dengan eluen n-heksana, etil asetat dan metanol yang perbandingannya dinaikkan secara gradien. Kemudian dilakukan KLT terhadap semua fraksi untuk melihat profil kandungan senyawa yang terdapat pada setiap fraksi berdasarkan pola noda pada plat KLT. Fraksi yang pola noda pada plat KLTnya mirip dengan piperin standar dimurnikan lebih lanjut dengan metode KVC yang perbandingan eluennya tidak dinaikkan secara gradien dan kromatografi radial.

Sebanyak 18,2418 gram ekstrak metanol buah cabe jawa yang sudah dipekatkan dilakukan pemisahan metode KVC. Sebelum dilakukan pemisahan, sampel diimpregnasi dengan menggunakan silika gel sebanyak 26,7664 gram. Silika gel yang digunakan adalah silika gel yang berukuran 230-240 mesh. Sampel dilarutkan dalam aseton dan diimpreg dengan cara diteteskan sedikit demi sedikit ke silika gel sambil diaduk. Aseton dipilih sebagai pelarut karena aseton adalah pelarut yang mudah menguap dan bersifat semipolar sehingga dapat mengekstrak senyawa yang polar maupun semipolar.

Berdasarkan analisa kromatogram pada plat KLT, eluen yang digunakan yaitu : n heksana 100% (3x), campuran n heksana dan etil asetat dengan perbandingan 9:1 (5x), 8,5:1,5 (4x), 8:2 (4x), etil asetat 100% (2x), dan metanol 100% (2x) dengan volume eluen 100 ml setiap kali elusi. Pemisahan ini menghasilkan 20 fraksi yang kemudian akan dilakukan KLT menggunakan eluen dengan perbandingan 7:3 untuk melihat senyawa yang terkandung pada tiap fraksi. Perbandingan ini digunakan karena eluen yang paling baik dalam memisahkan senyawa-senyawa dalam ekstrak. Berdasarkan kemiripan pola noda pada plat KLT,

Ruth Natalia Pangaribuan, 2018

ISOLASI, KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA PIPERIN DARI EKSTRAK METANOL BUAH CABE JAWA (Piper retrofractum) ASAL JAWA BARAT

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

20 fraksi digabungkan menjadi 4 fraksi yaitu fraksi A-D. Keempat fraksi dipekatkan dengan *vacuum rotatory evaporator* dan diperoleh massa masing-masing fraksi yaitu A (fraksi 1-5) 2,6505 gram, B (fraksi 6-12) 4,393 gram, C (fraksi 13-17) 2,1513 gram dan D (fraksi 18-20) sebanyak 7,5604. Keempat fraksi dilakukan KLT bersama dengan piperin standar untuk melihat fraksi yang pola noda pada kromatogramnya paling mirip dengan piperin standar. Berdasarkan profil nodanya dan sifat kepolaran piperin yaitu semi polar yang cenderung ke arah polar maka fraksi yang dilakukan pemurnian lebih lanjut adalah fraksi D.

Pemurnian fraksi D dilakukan dengan metode KVC dengan eluen yang digunakan yaitu : n heksan 100% (3x), campuran n heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8,5:1,5 (4x), 8:2 (5x), etil asetat 100% (2x) dan metanol (1x). Perbandingan eluen ini diperoleh dengan melihat pola noda pada plat KLT. Sebelum dilakukan pemurnian fraksi D diimpregnasi dengan 13, 5682 gram silika gel impreg. Proses pemurnian ini menghasilkan 15 fraksi yang akan dilakukan KLT pada tiap fraksinya. Berdasarkan kemiripan pola noda pada plat KLT, 15 fraksi digabungkan menjadi 2 fraksi yaitu D.1 (fraksi 1-9) dan D.2 (fraksi 10-15). Pola noda pada plat KLT menunjukkan masih terdapat lebih dari satu spot noda sehingga fraksi D.2 dimurnikan lagi dengan menggunakan metode KVC yang perbandingan eluennya tidak dinaikkan secara gradien.

Proses pemurnian fraksi D.2 diawali dengan pemekatan dengan *vacuum rotatory evaporator* dan impregnasi dengan 13 gram silika gel impreg. Eluen yang digunakan dalam pemurnian ini adalah campuran n heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8,5:1,5 (10x) dan metanol 100% (3x). Tahap ini menghasilkan 13 fraksi untuk kemudian dilakukan KLT. Berdasarkan kemiripan pola noda pada plat KLT, 13 fraksi digabungkan menjadi 3 fraksi yaitu D.2.1 (fraksi 1-9), D.2.2 (fraksi 10-12) dan D.2.3 (fraksi 13). Fraksi yang nodanya paling mirip dengan piperin standar yaitu fraksi D.2.2 sehingga fraksi D.2.2 dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* untuk dilakukan pemurnian dengan metode kromatografi radial.

Proses pemurnian dengan kromatografi radial menggunakan 103,5 mg fraksi D.2.2 yang dilarutkan dengan aseton dan diteteskan sedikit demi sedikit ke dalam alat kromatotron. Sebelum dilakukan pemisahan, plat kromatografi dicuci dahulu dengan 50 ml nheksan. Eluen yang digunakan yaitu campuran etil asetat dan n-heksan dengan perbandingan 7:3, etil asetat 100% dan metanol 100%. Berdasarkan pemisahan ini diperoleh 9 fraksi dan dilakukan KLT untuk melihat profil senyawa yang terkandung pada tiap fraksi. Berdasarkan kemiripan pola noda pada kromatogram, 9 fraksi digabung menjadi 3 fraksi yaitu D.2.2.1 (fraksi 1-

4), D.2.2.2 (fraksi 5-6) dan D.2.2.3 (fraksi 7-9). Perbandingan ketiga pola noda pada kromatogram dengan piperin standar menunjukkan fraksi D.2.2.2 memiliki pola noda yang paling mirip dengan piperin standar sehingga fraksi D.2.2.2 digabungkan kemudian dipekatkan dengan vacuum rotary evaporator. Fraksi D.2.2.2 dikristalisasi dan kristal yang terbentuk diidentifikasi dengan KLT untuk mengetahui senyawa yang diperoleh sudah murni atau beli berdasarkan pola noda pada plat KLT.

3.3.3. Karakterisasi senyawa piperin

Senyawa piperin yang berhasil diisolasi dikarakterisasi dengan melakukan uji titik leleh menggunakan *melting point block* dan penentuan rumus struktur senyawa dengan metode spektroskopi yaitu spektroskopi *Infra Red* (IR) dan spektroskopi $^1\text{H Nuclear Magnetic Resonance}$ (NMR).

3.3.4. Uji Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan radikal DPPH oleh senyawa piperin hasil isolasi. Parameter pengukuran aktivitas penghambatan ini dinyatakan dalam IC_{50} (*inhibition concentration*), yaitu konsentrasi senyawa antioksidan yang menyebabkan hilangnya aktivitas radikal DPPH sebanyak 50%. Berdasarkan parameter dinyatakan bahwa semakin rendah nilai IC_{50} suatu senyawa maka aktivitas antioksidannya semakin baik (Molyneux, 2004). Menurut (Blois, 1958) senyawa dinyatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} nya berada pada rentang 50-100, sedang jika pada rentang 100-150 ppm dan lemah jika pada rentang 150-210 ppm.

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini didasarkan pada penerimaan elektron atau radikal hidrogen oleh senyawa antioksidan menjadi molekul yang stabil yang reaksinya ditunjukkan dengan penurunan absorbansi dan pemudaran warna dari ungu menjadi kuning. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan spektrometer UV pada panjang gelombang 517 nm (Moon & Shibamoto, 2009). Pada penelitian ini, uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap asam askorbat sebagai kontrol positif dan piperin hasil isolasi.

Ruth Natalia Pangaribuan, 2018

ISOLASI, KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA PIPERIN DARI EKSTRAK METANOL BUAH CABE JAWA (*Piper retrofractum*) ASAL JAWA BARAT

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.3.4.1. Uji aktivitas antioksidan asam askorbat

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian dimulai dengan cara membuat larutan asam askorbat dengan berbagai konsentrasi yaitu (1, 3, 5, 7 dan 9) ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan larutan DPPH 40 ppm dalam metanol sebanyak 2 ml. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm.

3.3.4.2. Uji aktivitas antioksidan piperin

Pengujian aktivitas antioksidan piperin diperlakukan mirip seperti asam askorbat, dengan cara membuat larutan piperin dengan berbagai konsentrasi yaitu (200, 400, 500 dan 600) ppm dan memipetnya masing-masing sebanyak 4 ml ke dalam botol vial, kemudian menambahkan larutan DPPH 40 ppm dalam metanol sebanyak 2 ml. Kontrol yang digunakan yaitu DPPH sebanyak 2 ml dan metanol sebanyak 4 ml. Campuran dihomogenkan dengan sonikasi selama 30 menit.

Pengukuran absorbansi sampel pada penelitian ini dilakukan sebanyak dua kali pengukuran (duplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung persen inhibisi radikal bebas (Q). Persen inhibisi dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

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

Keterangan :

Q= Persen inhibisi aktivitas radikal bebas

A_o = Absorbansi kontrol (pelarut + DPPH)

A_c = Absorbansi sampel (sampel + DPPH)

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 dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

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