

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun (*Artocarpus communis*) asal Jawa Barat. Penelitian ini dilaksanakan selama bulan Februari sampai dengan Juli 2019 di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati, Laboratorium Kimia Instrumen, Laboratorium Kimia Organik dan Bahan Alam Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI), dan Balai Penelitian Tanaman dan Sayuran (BALITSA). Determinasi tanaman sukun dilakukan di Institut Teknologi Bandung (ITB).

3.2 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dimulai dari preparasi sampel, proses ekstraksi senyawa fenolik dalam simplisia daun sukun, proses karakterisasi simplisia daun sukun, karakterisasi profil fisikokimia ekstrak metanol daun sukun, dan uji aktivitas antioksidan disajikan dalam Gambar 3.1.

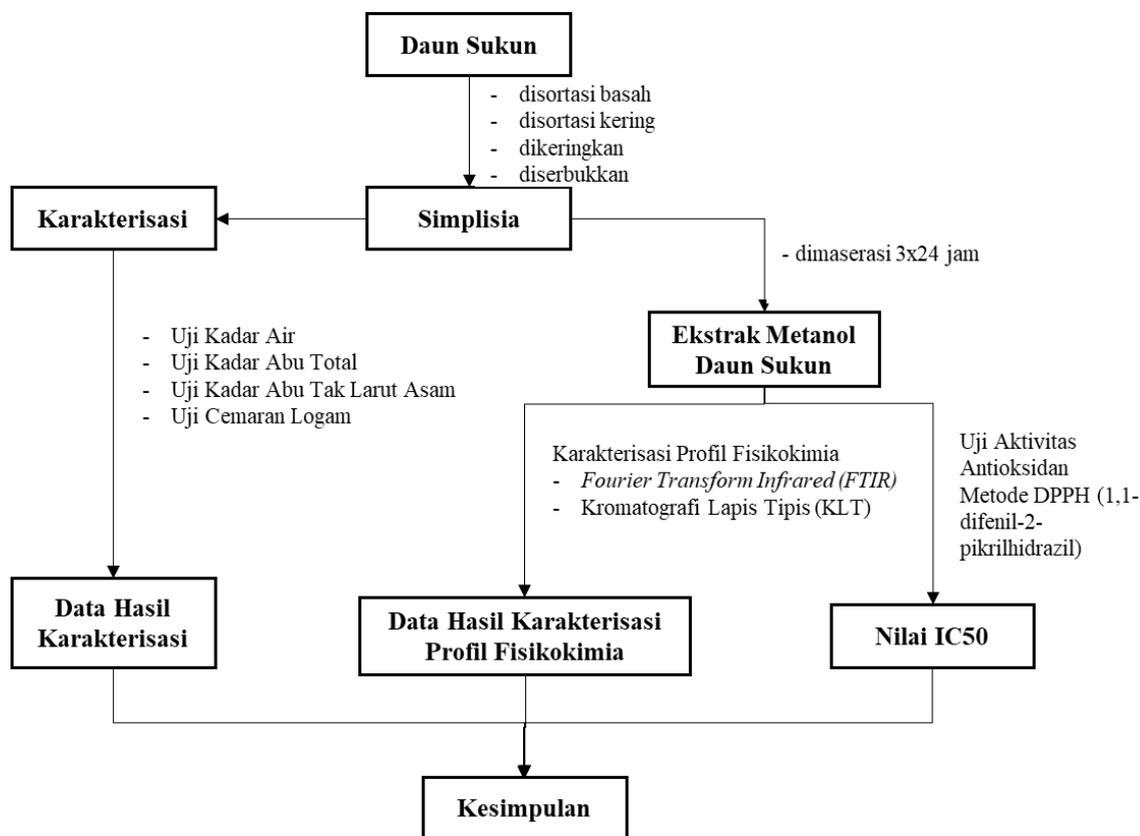
3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi *blender*, *vacuum rotary evaporator*, neraca analitik, oven, cawan krus bertutup, pembakar bunsen, tanur, tang krus, batang pengaduk, *hot plate*, desikator, cawan porselen, pH meter, alat-alat gelas, corong Buchner, set peralatan KLT, FTIR Shimadzu 8400, dan spektrofotometer UV-Vis, *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Daun Sukun (*Artocarpus communis*) sebagai bahan utama dalam wujud serbuk simplisia, dan bahan tambahan yang dibutuhkan adalah metanol teknis yang telah didestilasi, aquades, kertas saring tak berabu (Whatman No. 40), kertas saring, asam klorida 10%, asam askorbat, n-heksana, etil asetat, diklorometana, asetonitril, metanol p.a, dan DPPH.



Gambar 3.1 Bagan Prosedur Penelitian

3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi yang dilakukan terhadap simplisia daun sukun meliputi beberapa parameter uji, seperti penentuan kadar air, abu total, abu tak larut dalam asam, dan cemaran logam.

3.4.1.1 Penentuan Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan mengacu pada prosedur SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman, dengan metode oven. Simplisia daun sukun ditimbang 1-2 g pada cawan kurs 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.

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

Keterangan: W = bobot cuplikan sebelum dikeringkan (g)

W₁ = kehilangan bobot setelah dikeringkan (g)

3.4.1.2 Penentuan Kadar Abu Total

Penentuan kadar abu total dilakukan mengacu pada prosedur SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Simplisia daun sukun ditimbang 2-3 g dalam cawan porselen yang sudah diketahui bobotnya. Kemudian diarangkan diatas nyala pembakar, lalu diabukan dalam tanur pada suhu 550°C sampai pengabuan sempurna. Setelah itu didinginkan dalam desikator, ditimbang dan diulangi hingga diperoleh bobot yang tetap.

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

Keterangan: W = bobot sampel sebelum diabukan (g)

W₁ = bobot sampel+cawan sesudah diabukan (g)

W₂ = bobot cawan kosong (g)

3.4.1.3 Penentuan Kadar Abu Tak Larut Dalam Asam

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

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

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

3.4.1.4 Penentuan Cemaran Logam Berat

Penentuan cemaran logam yang dilakukan terhadap simplisia meliputi penentuan cemaran Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) mengacu pada prosedur AOAC 999.11-2005 *Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods*. Arsen (As) mengacu pada prosedur SNI 01-4866-1998 tentang Cara Uji Cemaran Arsen dalam Makanan. Raksa (Hg) mengacu pada prosedur SNI 19-2896-1998 tentang Cara Uji Cemaran Logam dalam Makanan.

3.4.1.4.1 Penentuan Cemaran Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd)

Pada prinsipnya, penentuan cemaran timbal dan kadmium dilakukan dengan mengeringkan dan mengabukan sampel pada suhu 450°C secara bertahap ($\leq 50^\circ\text{C}/\text{jam}$). Ditambahkan HCl 6M (1 + 1) dan larutan diuapkan hingga kering. Residu dilarutkan dalam HNO₃ 0,1 M dan analisis ditentukan dengan prosedur menggunakan *graphite furnace*.

Penentuan cemaran timbal dilakukan dengan cara ditimbang 10-20 gram sampel dalam cawan. Dikeringkan dalam oven pada 100°C. Kemudian dilanjutkan sesuai dengan tipe tungku yang digunakan. Pada tahap pengabuan, cawan ditempatkan dalam furnace pada suhu awal $\leq 100^\circ\text{C}$, lalu suhu dinaikkan secara bertahap $\leq 50^\circ\text{C}/\text{jam}$ hingga mencapai 450°C dan dibiarkan selama 8 jam atau semalaman. Dibuat larutan standar Pb dengan melarutkan 1000 g Pb dalam 7 ml HNO₃ 65% dalam labu takar 1 L dan ditandabatkan dengan aquades.

Pra-pengabuan dilakukan pada sampel dengan menempatkan cawan berisi sampel dengan penutup kaca pada piring keramik dan dibiarkan udara bersih keluar melalui tabung kaca menyapu sampel. Simpan lampu *infrared* (IR) pada penutup. Sampel pra-pengabuan meningkat suhunya secara perlahan dengan lampu IR secara bertahap meningkatkan suhu

pada *hot plate* hingga maksimum. Suhu akhir pada piring keramik berada pada sekitar 300°C. Waktu yang diperlukan untuk pengabuan bervariasi tergantung sampel. Simpan cawan dalam furnace pada suhu 200-250°C dan secara perlahan suhunya ditingkatkan hingga 450°C dengan laju kurang lebih 50°C/ jam. Biarkan cawan dalam selama 8 jam atau semalaman. Lalu, keluarkan cawan dari furnace dan dibiarkan dingin. Basahi abu dengan 1-3 ml air dan pekatkan menggunakan *hot plate*. Simpan kembali cawan dalam furnace pada suhu $\leq 200^\circ\text{C}$ dan naikkan suhu (50-100°C/jam) hingga 450°C. Dilanjutkan dengan pengabuan pada suhu 450°C selama 1-2 jam. Ulangi prosedur hingga sampel benar-benar menjadi abu (abu berwarna putih/abu atau hingga sedikit berwarna). Jumlah pengulangan bervariasi bergantung pada jenis sampel. Tambahkan 5 ml HCl 6M, untuk memastikan bahwa semua abu bersentuhan dengan asam. Pekatkan asam menggunakan *hot plate*. Larutkan residu dalam 10,0-30,0 ml HNO₃ 0,1 M. Aduk dengan hati-hati hingga semua abu bersentuhan dengan asam. Tutup dengan kaca arloji dan dibiarkan selama 1-2 jam. Kemudian aduk larutan dalam wadah dengan batang pengaduk, kemudian pindahkan ke dalam botol plastik. Perlakukan blanko dengan cara yang sama seperti sampel, menggunakan furnace AAS untuk penentuan timbal dan kadmium. Pada timbal digunakan panjang gelombang 283,3 nm dan untuk kadmium digunakan panjang gelombang 228,8 nm.

3.4.1.4.2 Penentuan Cemaran Raksa (Hg)

Pada prinsipnya, penentuan cemaran raksa dilakukan dengan mereaksikan senyawa raksa dengan larutan pereduksi (NaBH₄ dan SnCl₂) dalam keadaan asam guna membentuk gas atomik Hg dan diikuti dengan pembacaan absorban menggunakan AAS tanpa nyala dengan panjang gelombang 253,7 nm.

Penentuan cemaran raksa dilakukan dengan cara pengabuan basah. Ditimbang 5 g sampel ke dalam labu destruksi, ditambahkan 25 ml H₂SO₄ 18 N, 20 ml HNO₃ 7 N, 1 ml larutan natrium molibdat 2%, dan 5-6 butir batu didih. Dihubungkan labu destruksi dengan pendingin dan dipanaskan

selama 1 jam, kemudian didinginkan selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 20 ml $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin. Dihentikan aliran air pada pendingin dan dipanaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih, lalu dilanjutkan pemanasan selama 10 menit, kemudian didinginkan. Setelah itu, ditambahkan 10 ml air melalui pendingin sambil labu digoyang-goyang dan dididihkan lagi selama 10 menit. Kemudian pemanasan dihentikan dan pendingin dicuci dengan 15 ml aquades sebanyak 3 kali, didinginkan sampai suhu kamar.

Larutan destruksi sampel dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 ml dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas. Selain itu, dibuat blanko dengan cara mencampurkan seluruh pereaksi yang ditambahkan pada sampel dan larutan deret standar raksa. Setelah itu, ditambahkan 20 ml larutan pereduksi ke dalam larutan deret standar, larutan destruksi dan larutan blanko. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan AAS tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.

3.4.1.4.3 Penentuan Cemaran Arsen (As)

Penentuan cemaran arsen dilakukan dengan cara pengabuan kering. Ditimbang 10 g sampel dalam cawan, lalu ditambahkan 2,5 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 25 ml HNO_3 p.a. diaduk dengan sempurna dan diuapkan diatas penangas air hingga kering. Kemudian diarangkan dalam furnace pada suhu 500°C selama 2 jam. Dibasahkan dengan HNO_3 p.a. diuapkan lagi dan diabukan lagi selama 1 jam pada suhu 500°C . Setelah itu, dilarutkan dengan HCl 1:3 dan ditandabatkan dengan aquades hingga 50 ml.

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan metode AAS. Disiapkan larutan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan alat. Dipipet 25 ml larutan destruksi yang telah dibuar dan ditambahkan 2 ml HCl 8M dan 0,1 ml KI 20%, kemudian dibiarkan selama minimal 2 menit. Diukur absorbansi larutan sampel, larutan deret standar, dan larutan blanko dengan spektroskopi serapan atom.

3.4.2 Profil Fisikokimia

Karakterisasi profil fisikokimia dilakukan terhadap ekstrak metanol daun sukun dimulai dengan proses ekstraksi dilakukan pada sampel daun sukun yang sudah dikeringkan dan diserbukkan sebanyak 307 g, diekstraksi dengan pelarut metanol sebanyak 1,5 L. Teknik ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut metanol selama 3x24 jam pada suhu ruang dan pelarut diganti setiap 24 jam dengan catatan maserasi ketiga diganti pelarutnya setelah 48 jam. Ekstrak hasil maserasi disaring lalu pelarutnya diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*.

3.4.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis komponen senyawa pada ekstrak metanol daun sukun dilakukan dengan KLT berfasa normal dan terbalik menggunakan eluen n-heksana, etil asetat, metanol, dan diklorometana. Ekstrak dilarutkan dalam metanol, kemudian ditotolkan pada plat KLT berukuran 5 cm x 1 cm (memiliki tanda batas atas dan bawah 0,5 cm) menggunakan pipa kapiler. Lalu dimasukkan dalam *chamber* tertutup untuk berfasa normal berisi masing-masing campuran eluen n-heksana:etil asetat dengan berbagai perbandingan 7:3, 1:1, 8:2; campuran eluen diklorometana:metanol dengan perbandingan 9:1; campuran eluen etil asetat:metanol dengan perbandingan 9:1. Sedangkan untuk KLT fasa terbalik menggunakan eluen metanol 100%, perbandingan eluen metanol:air 1:1 dan metanol:asetonitril 1:1. Posisi plat KLT pada KLT berfasa normal dan terbalik yaitu berdiri, dimana sebelumnya *chamber* telah dijenuhkan dengan cara memasukkan kertas saring hingga kertas saring terelusi seluruhnya dengan eluen. Setelah itu divisualisasi dengan sinar UV 254 nm untuk diamati berapa banyak noda yang terpisah pada plat. Lalu dihitung nilai Rfnya untuk masing-masing noda.

3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun sukun dilakukan menggunakan metode DPPH dengan asam askorbat untuk verifikasi metode,

sesuai dengan metode yang digunakan oleh Brand-William dkk. (1995) yang dimodifikasi.

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, setelah ditambahkan 2 ml larutan DPPH 60 ppm dalam metanol. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian ekstrak metanol daun sukun diperlakukan sama seperti asam askorbat, dengan cara membuat larutan ekstrak dalam metanol dengan berbagai konsentrasi yaitu (5, 10, 15, 20, dan 25) ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml ke dalam botol vial, setelah ditambahkan 2 ml DPPH 60 ppm dalam metanol. Kontrol yang digunakan yaitu 2 ml DPPH 60 ppm dan 4 ml metanol.

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

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

Keterangan: Q = persen inhibisi aktivitas radikal bebas

A_o = absorbansi kontrol (pelarut+DPPH)

A_c = absorbansi sampel (sampel+DPPH)

Kemudian untuk menentukan 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 = kemiringan

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:

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