

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Tujuan Operasional Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengisolasi senyawa yang terdapat dalam fraksi *n*-heksana:etil asetat (4:1) daun *Cryptocarya ferrea* dan melakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan *Reducing Power*.

#### B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Kimia FMIPA UNJ Jakarta Timur, mulai bulan Januari 2014 sampai Januari 2015.

#### C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini meliputi metode ekstraksi, partisi padat-cair menggunakan pelarut *n*-heksana, *n*-heksana:etil asetat (4:1), *n*-heksana:etil asetat (1:3) dan etil asetat (EtOAc). Fraksinasi ekstrak *n*-heksana:etil asetat (4:1) dan pemurnian fraksi *n*-heksana:etil asetat (4:1) daun *Cryptocarya ferrea* dengan berbagai teknik kromatografi, antara lain Kromatografi Vakum Cair, Kromatografi Lapis Tipis dan

Kromatotron. Senyawa murni yang diperoleh diidentifikasi strukturnya dengan UV-Vis, FT-IR dan NMR. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal DPPH dan *Reducing Power*.

#### **D. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum digunakan, neraca analitik, peralatan Kromatografi Vakum Cair (KVC), alat penguap vakum putar/*rotary evaporator* (EYELA USA N-1001-S-WD, Cat Num 216959), *magnetic stirrer* (IKA C-MAG HS 7), lampu UV, peralatan kromatografi lapis, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, Biospec 1601). Instrumen yang digunakan adalah Spektrofotometer Infra Merah (IR) *Perkin Elmer Spectrum One*, Spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) JEOL JNM ECA – 500 di Institusi Teknologi Bandung.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Cryptocarya ferrea* yang diperoleh dari Kebun Raya Cibodas, Jawa Barat dan telah diidentifikasi di Herbarium Bogoriensis LIPI Cibinong. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, berbagai pelarut dengan kualifikasi teknis yang telah didestilasi (*n*-heksana dan etil asetat), dan silika gel (Merck Cat. Num 105553) sebagai fasa diam dalam kromatografi. Uji aktivitas

antioksidan menggunakan reagen 1,1-difenil-pikrilhidrazil, kalium ferisianida ( $K_3Fe(CN)_6$ ),  $FeCl_3$ , asam trikloroasetat (TCA) (Merck), asam askorbat (Merck milipore Cat. Num 1531) dan BHT (Brataco Chem) dan juga akuades.

## **E. Prosedur Penelitian**

### **1. Pengumpulan dan Pengolahan Sampel**

Daun kering *Cryptocarya ferrea* diperoleh dari Kebun Raya Cibodas, Jawa Barat dan spesimennya sudah diidentifikasi di Herbarium Bogoriensis. Daun kering *Cryptocarya ferrea* dihaluskan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk dengan massa sebesar 2,5 Kg.

### **2. Partisi Padat Cair Daun *Cryptocarya ferrea***

Daun *Cryptocarya ferrea* dipartisi padat-cair menggunakan pelarut secara berturut-turut *n*-heksana, *n*-heksana:etil asetat (4:1), *n*-heksana:etil asetat (1:3), dan etil asetat sehingga didapat fraksi-fraksi yang terlarut dalam masing-masing pelarut. Fraksi-fraksi tersebut kemudian dikeringkan dengan *rotary evaporator* dan massa fraksi *n*-heksana:etil asetat (4:1) sebesar 53,3 g.

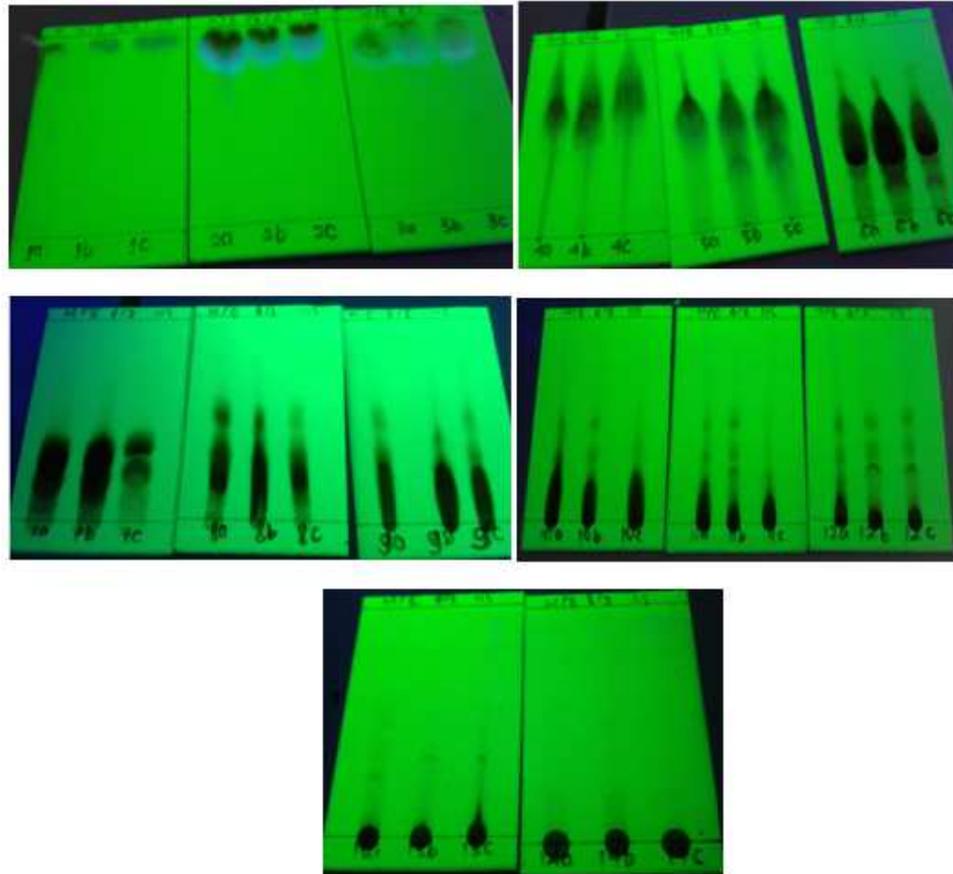
### 3. Tahap Isolasi dan Pemisahan

Fraksi *n*-heksana:etil asetat (4:1) daun *Cryptocarya ferrea* dipisahkan dengan berbagai teknik kromatografi, yaitu Kromatografi Vakum Cair (KVC), kromatotron dan dilanjutkan dengan monitoring menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi *n*-heksana:etil asetat (4:1) dari daun *Cryptocarya ferrea* dipisahkan dengan kromatografi vakum cair menggunakan fasa diam berupa silika gel kombinasi eluen yang dimulai dari pelarut *n*-heksan 100%, *n*-heksan:etil asetat (9:1), *n*-heksan:etil asetat (8:2), *n*-heksan:etil asetat (7:3), *n*-heksan:etil asetat (1:1) dan etil asetat 100%.

Proses tahapan awal pada fraksi *n*-heksana:etil asetat (4:1) adalah pemisahan menjadi 4 tahap. Pemisahan tahap pertama (13,3 g) dilakukan pemisahan dengan KVC menggunakan eluen *n*-heksan 100%, *n*-heksan:etil asetat (9:1), *n*-heksan:etil asetat (8:2), *n*-heksan:etil asetat (7:3), *n*-heksan:etil asetat (1:1) dan etil asetat 100% menghasilkan 14 fraksi utama yaitu A<sub>1</sub> (444,7 mg); A<sub>2</sub> (245 mg); A<sub>3</sub> (227,4 mg); A<sub>4</sub> (1586,8 mg); A<sub>5</sub> (720 mg); A<sub>6</sub> (1069 mg); A<sub>7</sub> (843,9 mg); A<sub>8</sub> (880,4 mg); A<sub>9</sub> (875,4 mg); A<sub>10</sub> (793,5 mg); A<sub>11</sub> (926 mg); A<sub>12</sub> (431,9 mg); A<sub>13</sub> (427,7 mg); A<sub>14</sub> (377,5 mg). Pemisahan tahap kedua (13,3 g) dilakukan pemisahan dengan KVC menggunakan eluen yang sama yaitu *n*-heksan 100%, *n*-heksan:etil asetat (9:1), *n*-heksan:etil asetat (8:2), *n*-heksan:etil asetat (7:3), *n*-heksan:etil asetat (1:1) dan etil asetat 100% menghasilkan 14 fraksi

utama yaitu B<sub>1</sub> (568,2 mg); B<sub>2</sub> (358,5 mg); B<sub>3</sub> (121,9 mg); B<sub>4</sub> (2400,6 mg); B<sub>5</sub> (779,1 mg); B<sub>6</sub> (1647,5 mg); B<sub>7</sub> (1050,6 mg); B<sub>8</sub> (962,1 mg); B<sub>9</sub> (1043,1 mg); B<sub>10</sub> (784,5 mg); B<sub>11</sub> (1242,7 mg); B<sub>12</sub> (524,2 mg); B<sub>13</sub> (904,8 mg); B<sub>14</sub> (350,9 mg).

Pemisahan tahap ketiga (13,3 g) dilakukan pemisahan dengan KVC menggunakan eluen *n*-heksan 100%, *n*-heksan:etil asetat (9:1), *n*-heksan:etil asetat (8:2), *n*-heksan:etil asetat (7:3), *n*-heksan:etil asetat (1:1) dan etil asetat 100% menghasilkan 14 fraksi utama yaitu C<sub>1</sub> (607 mg); C<sub>2</sub> (401,2 mg); C<sub>3</sub> (119 mg); C<sub>4</sub> (960,3 mg); C<sub>5</sub> (816,8 mg); C<sub>6</sub> (1899,1 mg); C<sub>7</sub> (1217,5 mg); C<sub>8</sub> (924,2 mg); C<sub>9</sub> (1179,3 mg); C<sub>10</sub> (963,8 mg); C<sub>11</sub> (1016,3 mg); C<sub>12</sub> (380,1 mg); C<sub>13</sub> (395,2 mg); C<sub>14</sub> (309,5 mg). Pemisahan tahap keempat (13,4 g) dilakukan pemisahan dengan KVC menggunakan eluen yang sama yaitu *n*-heksan 100%, *n*-heksan:etil asetat (9:1), *n*-heksan:etil asetat (8:2), *n*-heksan:etil asetat (7:3), *n*-heksan:etil asetat (1:1) dan etil asetat 100% menghasilkan 14 fraksi utama yaitu D<sub>1</sub> (308,2mg); D<sub>2</sub> (482,8 mg); D<sub>3</sub> ( 68 mg); D<sub>4</sub> (1127,6 mg); D<sub>5</sub> (759,8 mg); D<sub>6</sub> (926,4 mg); D<sub>7</sub> (905,7 mg); D<sub>8</sub> (927,6 mg); D<sub>9</sub> (667,9 mg); D<sub>10</sub> (955,2 mg); D<sub>11</sub> (781,4 mg); D<sub>12</sub> (525,3 mg); D<sub>13</sub> (435,8 mg); D<sub>14</sub> (373,3 mg).

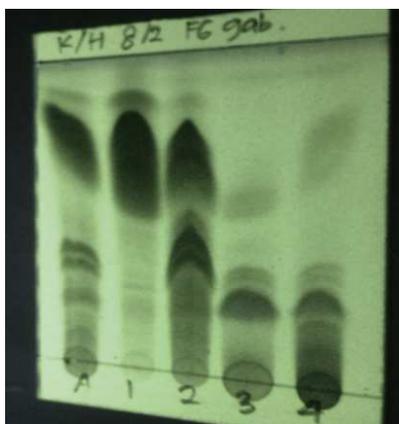


**Gambar 12.** Kromatogram Hasil Pemisahan KVC Tahapan Awal Fraksi *n*-heksan:etil asetat (4:1)

Hasil kromatogram pada gambar 12, dari empat kali KVC tersebut didapatkan 14 gabungan-gabungan fraksi yang menjadi fraksi utama. Berat dari 14 fraksi utama ini adalah f1 (1,5329 g); f2 (0,8142 g); f3 (6,2654 g); f4 (1,4112 g); f5 (3,9933 g); f6 (3,2267 g); f7 (3,2275 g); f8 (3,3105 g); f9 (6,8044 g); f10 (1,0202 g); f11 (0,6580 g); f12 (1,4746 g); f13 (1,4218 g); dan f14 (0,4540 g). Pada tahapan selanjutnya fraksi-fraksi tersebut dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan menggunakan KVC dan juga kromatotron.

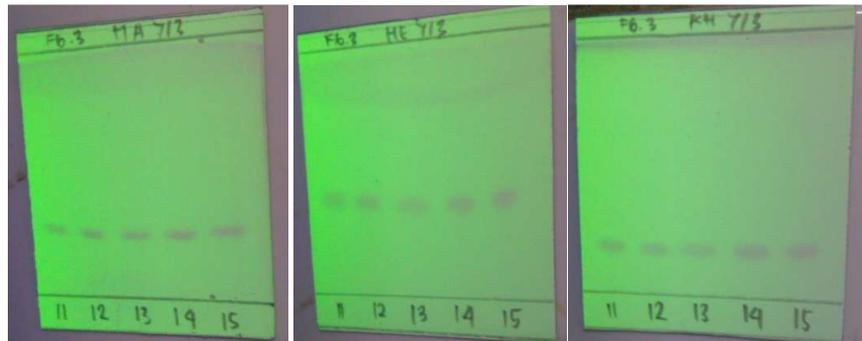
#### 4. Pemisahan Fraksi 6

Pemisahan fraksi 6 dengan berat sebesar 3,2267 gram dilakukan dengan metode KVC. Adapun eluen yang digunakan adalah dimulai dari kloroform;*n*-heksan (4:6) sampai dengan kloroform 100% yang berangsur-angsur ditingkatkan kepolarannya. Berdasarkan hasil pemisahan dengan KVC didapatkan 4 fraksi, yaitu 6<sub>1</sub> (544,2 mg); 6<sub>2</sub> (900,6 mg); 6<sub>3</sub> (71,4 mg); 6<sub>4</sub> (378,3 mg).



**Gambar 13.** Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi 6

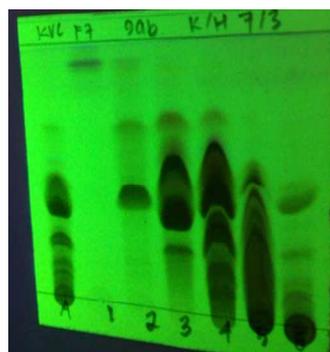
Tahapan selanjutnya dilakukan pemisahan dengan alat kromatotron pada fraksi 6<sub>3</sub> dengan eluen *n*-heksan:aseton (9,5:0,5) sampai dengan *n*-heksan:aseton (8:2) yang berangsur-angsur ditingkatkan kepolarannya. Kemudian dihasilkan 15 fraksi, dimana fraksi 6<sub>3.10</sub> (3,5 mg); 6<sub>3.11</sub> (2,2 mg); 6<sub>3.12</sub> (2,7 mg); 6<sub>3.13</sub> (3 mg); 6<sub>3.14</sub> (4 mg) sampai dengan 6<sub>3.15</sub> (3,4 mg) memiliki nilai R<sub>f</sub> yang sama dan terlihat berspot tunggal sehingga dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan sistem 3 eluen yang berbeda.



**Gambar 14.** Kromatogram Hasil Uji Kemurnian Sistem 3 Eluen Isolat 1

#### 5. Pemisahan fraksi 7

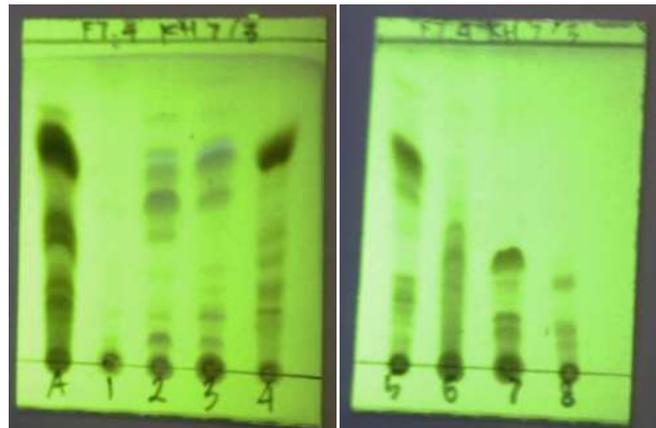
Pemisahan fraksi 7 dengan berat sebesar 3,2275 gram dilakukan dengan metode KVC. Eluen yang digunakan dimulai dari kloroform;*n*-heksan (6:4) sampai dengan kloroform:metanol (8:2) yang berangsur-angsur ditingkatkan kepolarannya. Berdasarkan hasil pemisahan dengan KVC didapatkan 6 fraksi, yaitu  $7_1$  (0,0026 mg);  $7_2$  (0,0184 mg);  $7_3$  (0,3119 mg);  $7_4$  (1,2335 mg);  $7_5$  (1,1803 mg);  $7_6$  (0,1302 mg).



**Gambar 15.** Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi 7

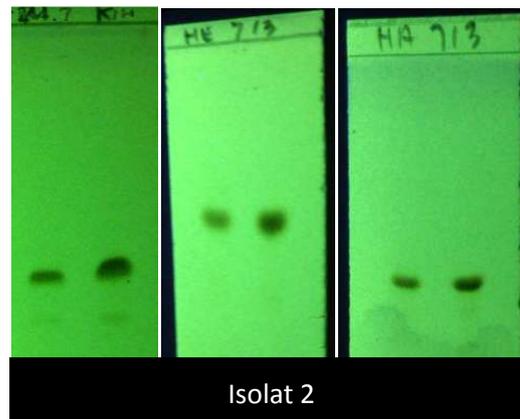
Tahapan selanjutnya pada fraksi  $7_4$  dibagi menjadi 2 yaitu  $7_{4A}$  dan  $7_{4B}$  yang kemudian dilakukan pemisahan dengan alat kromatotron pada fraksi  $7_{4A}$  dengan kloroform;*n*-heksan (4:6)

sampai dengan kloroform:metanol (8:2) yang berangsur-angsur ditingkatkan kepolarannya. Kemudian dihasilkan 8 fraksi, dimana fraksi  $7_{4A1}$  (8,8 mg);  $7_{4A2}$  (13,2 mg);  $7_{4A3}$  (15,7 mg);  $7_{4A4}$  (243,5 mg);  $7_{4A5}$  (103,8 mg);  $7_{4A6}$  (109,5 mg);  $7_{4A7}$  (22,1 mg);  $7_{4A8}$  (23,4 mg).



**Gambar 16.** Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi  $7_{4A}$

Fraksi  $7_{4A7}$  (22,1 mg), dilakukan hal yang sama yaitu pemisahan dengan alat kromatotron pada fraksi dengan eluen kloroform;*n*-heksan (4:6) sampai dengan kloroform:metanol (8:2) yang berangsur-angsur ditingkatkan kepolarannya. Kemudian dihasilkan 6 fraksi, dimana fraksi  $7_{4A7.5}$  dan  $7_{4A7.6}$  dengan berat senilai 2 mg memiliki nilai Rf yang sama dan terlihat spot tunggal sehingga dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan sistem 3 eluen yang berbeda.



**Gambar 17.** Kromatogram Hasil Uji Kemurnian Sistem 3 Eluen Isolat 2

#### 6. Tahap Identifikasi

Senyawa murni hasil isolasi ditentukan struktur molekulnya menggunakan data spektroskopi UV-Vis, spektroskopi Infra Merah (IR) dan spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

#### 7. Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Senyawa murni hasil isolasi dari fraksi *n*-heksana:etil asetat (4:1) daun *Cryptocarya ferrea* dilarutkan dalam pelarut metanol kemudian dibuat dengan konsentrasi bervariasi yaitu 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Masing-masing larutan uji ditambahkan 3mL larutan DPPH 0,1mM dalam metanol. Setiap campuran dikocok lalu disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi masing-masing sample diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 517 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan 2 kali pengulangan. Perlakuan

yang sama juga dilakukan terhadap BHT sebagai kontrol positif. Absorbansi kontrol merupakan nilai absorbansi DPPH tanpa sampel dan absorbansi sampel merupakan nilai absorbansi DPPH yang ditambah sampel. Data aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen yang dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

#### 8. Uji Aktivitas Antioksidan dengan *Reducing Power*

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode *reducing power*. Senyawa murni hasil isolasi dari fraksi *n*-heksana:etil asetat (4:1) daun *Cryptocarya ferrea* dilarutkan dengan pelarut akuades. Kemudian dibuat dengan konsentrasi bervariasi yaitu 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Sebanyak 1 mL larutan sampel ditambahkan larutan buffer fosfat (200mM; pH 6,6) dan larutan  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1% masing-masing sebanyak 2,5 mL. Setiap campuran dikocok lalu diinkubasi pada suhu 50 °C selama 20 menit. Setelah itu, dilanjutkan dengan penambahan *trichloroacetic acid* (TCA) 1% sebanyak 2,5 mL dan disentrifuge selama 3 menit. Sebanyak 1mL filtrat dari campuran ditambahkan 2,5 mL akuades dan dilanjutkan dengan penambahan 1 mL  $\text{FeCl}_3$  0,1%. Absorbansi masing-masing sampel diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 700 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan 2 kali pengulangan. Perlakuan yang sama juga dilakukan

terhadap BHT dan Asam askorbat sebagai kontrol positif sedangkan untuk blangko merupakan campuran pelarut dan reagen tanpa sampel.

#### 9. Nilai $IC_{50}$

Setelah persen aktivitas antioksidannya diperoleh, selanjutnya ditentukan nilai  $IC_{50}$  pada semua sistem. Nilai  $IC_{50}$  dapat diketahui dengan membuat grafik hubungan antara log konsentrasi dengan persen aktivitas antioksidan. Log konsentrasi (ppm) sebagai sumbu x dan persen aktivitas antioksidan (%) sebagai sumbu y.

Berdasarkan grafik dapat ditentukan  $IC_{50}$ nya yaitu konsentrasi dimana aktivitas antioksidannya bernilai 50%, dengan menggunakan program *Interactive Chart Design Data VBA* (Add-In Software For Microsoft Excel 2007-2010). Berdasarkan metode *reducing power*, nilai  $IC_{50}$  ditentukan dengan log konsentrasi (ppm) sebagai sumbu x dan nilai aktivitas antioksidan sebagai sumbu y.