

BAB III

METODE PENELITIAN

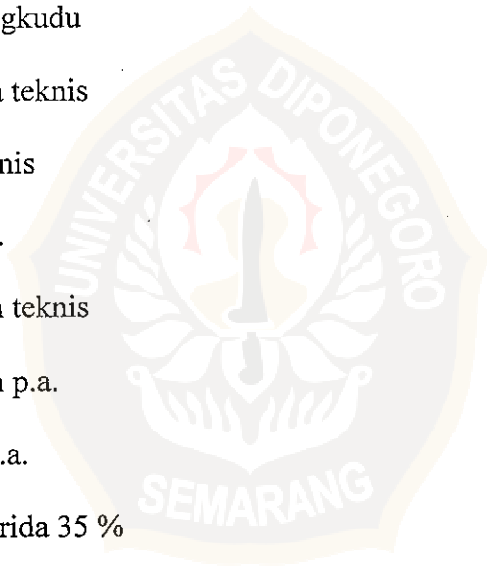
3.1 Sampel, Bahan, dan Alat

3.1.1 Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang cukup tua dengan warna agak kekuningan diperoleh dari Sekar Pace, Solo.

3.1.2 Bahan

- a. Buah Mengkudu
- b. *n*-Heksana teknis
- c. Etanol teknis
- d. Etanol p.a.
- e. Kloroform teknis
- f. Kloroform p.a.
- g. Metanol p.a.
- h. Asam Klorida 35 %
- i. Eter
- j. DPPH
- k. Magnesium Sulfat anhidrat
- l. β -Karoten
- m. Akuades



3.1.3 Alat

- a. Pengayak ukuran 40 mesh
- b. Penggilingan
- c. Termometer
- d. *Stopwatch*
- e. Spatula
- f. Pipa kapiler
- g. *Chamber*
- h. Plat KLT Merek GF₂₅₄
- i. *Rotary evaporator Buchie*
- j. Timbangan Analitis
- k. Satu set alat soklet
- l. Satu set alat refluks
- m. Spektro sequoia-Turner Co Model 390
- n. Oven
- o. Alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Pembuatan simplisia serbuk

Buah mengkudu diiris tipis kemudian di oven pada suhu 70 °C sampai kering. Simplisia kering digiling atau ditumbuk sampai halus dan diayak dengan pengayakan berukuran 40 mesh sehingga diperoleh serbuk mengkudu yang halus.

3.2.2 Pembuatan ekstrak

Serbuk mengkudu diekstraksi secara sokletasi dengan menggunakan masing-masing pelarut *n*-heksana, kloroform, dan etanol secara berurutan. Masing-masing filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 30-35 °C. Ekstrak kental ditimbang dan digunakan untuk uji penapisan fitokimia dan aktivitas antioksidan.

3.2.3 Hidrolisis asam

Sebanyak 4 gram *crude* dari ekstrak buah mengkudu dicampur dengan 20 mL metanol dan 100 mL HCl 6%, serta dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Selanjutnya campuran tersebut direfluks di atas penangas air pada suhu 60 °C selama 2,5 jam.

3.2.4 Analisis hasil hidrolisis asam dengan KLT

Ekstrak buah mengkudu sebelum dihidrolisis dan sesudah dihidrolisis dengan asam klorida, dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan berbagai macam eluen.

Ekstrak mengkudu yang akan dianalisis ditotolkan pada pelat KLT kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* yang sudah berisi eluen. Selanjutnya, noda-noda yang terbentuk pada pelat-pelat tersebut diamati dengan lampu ultraviolet pada $\lambda = 365 \text{ nm}$.

3.2.5 Ekstraksi senyawa aglikon

Filtrat metanol yang diperoleh dari proses hidrolisis, diekstraksi dengan pelarut eter menggunakan corong pisah. Selanjutnya, fraksi eter tersebut dicuci dengan akuades hingga netral, dan dilakukan ekstraksi lagi dengan menggunakan corong pisah. Fraksi eter yang diperoleh ditambah dengan MgSO₄ anhidrat dan

disaring, lalu fraksi eter yang bebas air diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 38-40 °C.

3.2.6 Uji antioksidan dengan pemudaran warna larutan DPPH

Larutan induk DPPH dibuat (3 mg/50 mL metanol) dan diambil 5 mL diencerkan dengan metanol sampai 10 mL kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 516 nm. Larutan induk ini digunakan untuk pengukuran aktivitas penangkapan radikal bebas pada berbagai konsentrasi ekstrak yang diukur setelah 30 menit (Navarro, 1993).

3.2.7 Analisis data hasil penelitian

Data yang diperoleh dari hasil penelitian di atas adalah perubahan absorbansi DPPH, kemudian dibuat suatu grafik hubungan antara absorbansi terhadap konsentrasi sampel. Dari grafik tersebut akan diketahui tingkat aktivitas antioksidan dari suatu sampel.

Setelah itu, dilakukan perbandingan grafik untuk sampel sebelum dihidrolisis dengan sampel sesudah dihidrolisis. Dari kedua grafik akan dapat diperoleh suatu kesimpulan bahwa sampel mana yang mempunyai tingkat aktivitas antioksidan yang lebih besar. Kesimpulan ini akan dikaitkan dengan perbedaan struktur molekul senyawa bioaktif antioksidan sebelum dan sesudah dihidrolisis.