

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Raden Fatah Palembang pada Juli 2020 - Maret 2021 .

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu neraca analitik, peralatan gelas kimia, batang pengaduk, corong pisah, corong kaca, seperangkat alat *Rotary evaporator* Yamato RE301C-W, alumunium foil, kertas saring, Instrumen FTIR Alpha dan Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV-1900.

Bahan yang digunakan kulit buah pisang uli (*Musa x paradisiaca L.AAB*), aquades, etanol 96% (*merck*), n-heksan (*merck*) , etil asetat (*merck*), FeCl_3 (*merck*), HCl pekat (*merck*), HCl 1% (*merck*), larutan H_2SO_4 (*merck*), Reagen *Lieberman-Bourchad* (*merck*), Reagen *mayer* (*merck*), serbuk Mg (*merck*), serta serbuk DPPH (*2-2,diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (*merck*).

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Ekstraksi Kulit Buah Pisang Uli

Kulit buah pisang uli dipotong-potong lalu dibersihkan dari kotoran dan dikeringkan dengan sinar matahari. Dihaluskan kulit buah pisang uli yang sudah kering dengan blender sehingga

menghasilkan serbuk. Sebanyak 200 gram serbuk kulit pisang dimaserasi menggunakan 1000 mL pelarut n-heksan yang direndam dalam waktu 24 jam dan beberapa kali pengadukan, sampel kemudian disaring sehingga menghasilkan filtrat dan ampas, prosedur dilakukan hingga 3 kali pengulangan. Ampas yang dihasilkan kemudian dikeringkan lalu dimaserasi ulang dengan 1000 mL etanol 96% selama 24 jam sambil dilakukan pengadukan, prosedur diulang sebanyak 3 kali sampai didapat filtrat dan ampas. Filtrat kemudian dipekatkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* disuhu 60°C. Ekstrak pekat kemudian difraksinasi dengan aquades dan etil asetat menggunakan corong pisah, lalu digoncang hingga terbentuk dua fasa. Fasa etil asetat yang dihasilkan, kemudian diuapkan lalu diuji fitokimia, identifikasi dengan instrumen FTIR serta uji aktivitas antioksidan [5].

3.3.2 Uji Kualitatif

Golongan metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, steroid, terpenoid, tanin serta saponin pada ekstrak kulit pisang uli diidentifikasi dengan beberapa pereaksi kimia.

3.3.2.1 Uji Flavonoid

Uji Flavonoid menggunakan beberapa tetes HCl pekat dan serbuk Mg yang ditambah pada ekstrak, perubahan warna menjadi jingga menunjukkan hasil positif [21].

3.3.2.2 Uji Alkaloid

Uji alkaloid dengan cara masukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi lalu tambahkan HCl 1% serta reagen *Mayer* beberapa tetes, sampel positif jika terdapat endapan berwarna putih. Dilakukan pengujian yang sama dengan pereaksi *Wagner* adanya endapan berwarna coklat pada hasil uji dinyatakan positif [21].

3.3.2.3 Uji Steroid dan Terpenoid

Uji steroid dan terpenoid menggunakan H_2SO_4 Pereaksi *Lieberman-Burchard* dan asam asetat anhidrat ditambahkan pada ekstrak, uji positif larutan menjadi biru kehijauan untuk steroid dan adanya warna merah kecoklatan atau cincin ping kecoklatan untuk terpenoid menunjukkan hasil positif [21].

3.3.2.4 Uji Tanin

Uji senyawa tanin dengan menggunakan 10 mL aquades yang ditambahkan pada ekstrak lalu dididihkan selanjutnya beri beberapa tetes $FeCl_3$. Perubahan warna menjadi hitam kebiruan atau coklat kehijauan menunjukkan hasil positif [21].

3.3.2.5 Uji Saponin

Uji senyawa saponin ekstrak ditambahkan 10 mL aquades dan dikocok selama waktu 30 detik, positif mengandung saponin dengan timbulnya buih yang stabil [21].

3.3.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan Instrumen Spektrofotometri UV-Vis.

3.3.3.1 Pembuatan Larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang 1.98 mg, dilarutkan dengan etanol 96% tempatkan pada labu ukur 50 mL, volume akhir ditambah etanol 96% hingga tera, lalu simpan dalam botol gelap [12].

3.3.3.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan 0.1 mM DPPH dipipet 2 mL lalu masukkan 2 mL etanol 96% pada tabung reaksi dan tutup menggunakan alumunium foil, homogenkan. Hitung serapan maksimumnya dalam rentang panjang gelombang 400-800 nm menggunakan Spektrofotometri UV-Vis [12].

3.3.3.3 Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH 0.1 mM sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu diberi 2 mL etanol 96%, tutup dengan alumunium foil dan dihomogenkan kemudian diinkubasi dengan waktu 30 menit diruang gelap. Ukur absorbansi dengan Spektrofotometri UV-Vis berdasarkan panjang gelombang maksimum yang diperoleh [12].

3.3.3.4 Pembuatan Larutan Uji

Sampel diambil sebanyak 50 mg lalu dilarutkan dengan etanol 96% dalam labu ukur 50 mL sehingga didapat larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Dibuat variasi konsentrasi (10,20,30,40) ppm. Diambil 2 mL setiap dari konsentrasi larutan uji kemudian dimasukkan pada tabung reaksi kimia lalu diberi larutan 0.1 mM DPPH 2 mL dan homogenkan, inkubasi dalam waktu 30 menit diruang gelap. Selanjutnya diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum [12].

3.3.3.5 Penentuan Nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Hasil absorbansi aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH kemudian dihitung menggunakan parameter IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*). Adapun rumus yang digunakan sebagai berikut [16] :

$$\%Inhibisi = \frac{AbsorbansiDPPH - AbsorbansiSampel}{AbsorbansiDPPH} \times 100\%$$

Keterangan :

Absorbansi DPPH : Absorbansi DPPH

Absorbansi Sampel : Absorbansi sampel uji

Nilai IC₅₀ dapat ditentukan menggunakan persamaan regresi linier dengan menerangkan relasi antara sumbu (x) sebagai konsentrasi dan sumbu (y) merupakan % inhibisi, ini diperoleh dengan mengukur nilai (x) yang didapat dengan menyertakan nilai 50 adalah (y), sehingga akan menghasilkan dalam bentuk :

$$y = ax + b$$

$$50 = ax + b$$

$$(x) IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$