

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus), mortir, stamper, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1800), *micro pipette* (Thermo scientific, Finn pipette F3), chamber serta alat-alat gelas (pyrex) yang bisa digunakan dalam laboratorium.

3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kristal etil *p-metoksisinamat* (EPMS), Rimpang kencur (*Kaempferia galanga*, Linn), silika gel 60 GF₂₅₄, metanol p.a (Full time), n-heksan (teknis), etil asetat (teknis), etanol 96% dan DPPH (2,2-Diphenyl-1-Pikril Hidrazil).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan ini merupakan penelitian yang akan dilaksanakan di Laboratorium Tugas Akhir Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia pada bulan april 2019 sampai Juli 2019, melalui tahapan-tahapan sebagai berikut:

3.3.1 Determinasi Tanaman

Tumbuhan dideterminasi di bagian Herbarium Laboratorium Taksonomi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjajaran.

3.3.2 Penyiapan Simplisia Rimpang Kencur

Rimpang kencur diperoleh dari perkebunan Lembang, Jawa Barat, rimpang kencur disortasi basah, dicuci, ditiriskan, dirajang melintang dengan ketebalan 2-5 mm dan dikeringkan pada suhu ruangan hingga kering (kadar air <10%).

3.3.3 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dari 711,57 gram dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 6,25 liter, ekstrak cair yang telah dikumpulkan diuapkan pada suhu ruangan menggunakan cawan penguap (Ditjen POM, 1986).

3.3.4 Pencucian Kristal Ekstrak Rimpang Kencur

Kristal yang dihasilkan dari ekstrak cair rimpang kencur dipisahkan terlebih dahulu, kemudian setelah dicuci menggunakan n-heksan, dibiarkan menguap dan kembali menjadi kristal, pencucian dilakukan beberapa kali hingga kristal berwarna putih hingga bening.

3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Kencur Dan EPM

A Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi 50 ppm dibuat dengan cara sebanyak 5 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dengan metanol p.a hingga 100 mL, kemudian diukur panjang gelombang serapan maksimum 500 -700 nm.

B Pengujian Larutan Pembanding Dengan Standar Asam

Askorbat ditimbang sebanyak 25 mg asam askorbat dan dilarutkan dalam 100 ml metanol sebagai larutan standar asam askorbat 250 ppm, kemudian dibuat variasi konsentrasi larutan standar asam askorbat. Sebanyak 2 ml larutan uji pada setiap variasi konsentrasi diambil, kemudian larutan diinkubasi selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dengan menggunakan *spektrofotometri UV-Vis* pada panjang gelombang 517 nm, dilakukan secara triplo (Blois, 1958).

C Pengujian Aktifitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan diadopsi dari metode blois 1958. DPPH ditimbang dilarutkan dalam 100 mL methanol, kemudian campuran tersebut diinkubasi di dalam ruangan yang gelap selama 30 menit. Penyimpanan larutan DPPH dalam lemari es (4°C) larutan ini dapat bertahan hingga 24-48 jam dengan pengurangan absorbansi

$\pm 0,2$. Ekstrak kencur dan etil parametoksisinamat Masing-masing $50\mu\text{g/mL}$ dipipet, ditambahkan $50\mu\text{g/mL}$ larutan DPPH (1:1) dengan berbagai variasi konsentrasi. Ukur absorbansi dengan spektrofotometri UV-Visible pada panjang gelombang 517 nm setelah 30 menit diinkubasi. Methanol digunakan sebagai blanko dan DPPH $50\mu\text{g/mL}$ sebagai standar lakukan triplo. Asam askorbat digunakan sebagai control standar dengan variasi konsentrasi. Semua prosedur dilakukan di ruang gelap (Diah, dkk., 2014; Blois 1958).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

D Penentuan Presentase Peredaman

Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung presentase peredaman DPPH dan membuat kurva kalibrasi dengan persentase peredaman DPPH sebagai sumbu y dan konsentrasi sampel uji/pembanding sebagai sumbu x, sehingga diperoleh persamaan regresi linier. IC_{50} dihitung dengan memasukkan nilai 50 dalam persamaan linier sebagai y kemudian dihitung x. IC_{50} hasil yang diperoleh merupakan konsentrasi IC_{50} dan asam askorbat digunakan sebagai pembanding.

3.3.6 Kromatografi lapis tipis Kristal EPMS

Metode KLT dilakukan pada kristal EPMS yang sudah dicuci dengan n-heksan. Pola kromatogram yang digunakan sebagai berikut:

Fase gerak : n-heksan teknis : etil asetat teknis (9:1)

Fase diam : silika gel 60 GF₂₅₄

Penampak noda: asam sulfat dalam metanol (Kenti,2017; Sudjad1988).

3.3.7 Uji Kemurnian Kristal EPMS Dengan KLT 2 Dimensi

Metode KLT 2 dimensi dilakukan pada kristal EPMS yang sudah dicuci dengan n-heksan. Pola kromatogram yang digunakan sebagai berikut:

Fase gerak : n-heksan teknis : etil asetat teknis : aseton (65:15:5)

Fase diam : silika gel 60 GF₂₅₄

Penampak noda: asam sulfat dalam metanol (Sudjadi 1988; Pratiwi, 2016).