

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu neraca analitik (Ohaus); spatel; toples kaca; seperangkat penyaring buchner; *rotary evaporator*; botol coklat 10 mL; oven; mikro pipet; tip mikro pipet; seperangkat spektrofotometer UV-Visibel (Shimadzu UV-1800 *dual beam*); sonikator; seperangkat KCKT (Waters 1525 binary pump, detektor UV Waters 486, kolom Agilent plus C18 5 μm , 4,6 x 150 mm); membran filter PTFE hidrofilik 0,45 μm ; spuit 3 cc; dan alat-alat gelas yang lazim di laboratorium kimia.

3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu buah mengkudu matang; etanol 96%; n-heksan; standar α -tokoferol *pro analysis* (Sigma Aldrich); metanol *HPLC grade* (Fulltime); asetonitril *HPLC grade* (Fulltime); dan *aquabidest* (Ikapharmindo).

3.3 Metode Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah mengkudu matang yang tumbuh di tiga tempat tumbuh yang berbeda, yaitu Kecamatan Pameungpeuk Kabupaten Garut (18 m dpl)³, Kecamatan Kiaracondong Kota Bandung (760 m dpl)⁴, dan Kecamatan Lembang Kabupaten Bandung Barat (1200 m dpl)⁵ yang dipanen pada bulan Maret hingga April 2019.

3.3.1 Pengukuran Kadar Air

Masing-masing sampel buah mengkudu dibersihkan dari kotoran yang menempel. Buah mengkudu yang telah bersih dipisahkan dari bijinya, lalu

³Badan Pusat Statistik Kab Garut, "Tinggi Wilayah di Atas Permukaan Laut (DPL) Menurut Kecamatan di Kabupaten Garut, 2015" (On-line), tersedia di: <https://garutkab.bps.go.id/statictable/2016/12/08/126/tinggi-wilayah-di-atas-permukaan-laut-dpl-menurut-kecamatan-di-kabupaten-garut-2015.html> (20 Desember 2018).

⁴Badan Pusat Statistik Kota Bandung, "Tinggi Wilayah di Atas Permukaan Laut (DPL) Menurut Kecamatan di Kota Bandung 2017" (On-line), tersedia di: <https://bandungkota.bps.go.id/statictable/2018/07/11/157/tinggi-wilayah-di-atas-permukaan-laut-dpl-menurut-kecamatan-di-kota-bandung-2017.html> (30 Desember 2018).

⁵Badan Penelitian Tanaman Rempah dan Obat "Kebun Percobaan Manoko" (On-line), tersedia di: https://balitro.litbang.pertanian.go.id/?page_id=3341 (4 Februari 2019).

daging buah diblender hingga halus. Daging buah halus ditimbang 3@2 gram di cawan penguap yang telah konstan bobotnya untuk diuapkan pada suhu 105° C hingga bobotnya konstan. Dihitung persentase kandungan air pada buah mengkudu, dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(w1-w2)}{(w1-w0)} \times 100\%$$

Ket:

w0 = Bobot cawan kosong

w1 = Bobot cawan + sampel (awal)

w2 = Bobot cawan + sampel (akhir)

3.3.2 Ekstraksi Buah Mengkudu

Daging buah ditimbang sebanyak 500 gram. Metode ekstraksi yang digunakan mengacu pada penelitian Widada (2013) yaitu daging buah mengkudu dibagi 2 bagian (@250 gram) setiap bagian diblender hingga menjadi bubur lalu dimaserasi dengan kondisi etanol 70% selama 24 jam dengan sesekali diaduk pada wadah terlindung dari cahaya. Kemudian disaring dengan penyaring Buchner. Filtrat dipekatkan hingga 150 mL lalu diekstraksi dengan 350 mL n-heksan dalam corong pisah. Fraksi non-polar diambil dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50° C hingga tidak tercium bau pelarut. Fraksi n-heksan kental dihitung rendemennya dengan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot fraksi}}{\text{bobot bahan awal}} \times 100\%$$

Fraksi kental ini disimpan dalam wadah terlindung cahaya di lemari pendingin untuk menjaga stabilitas α -tokoferol yang dikandungnya.

3.3.3 Penentuan Panjang Gelombang Analisis

Standar α -tokoferol ditimbang 100,0 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen. Dipipet 100 μ L larutan tersebut ke dalam labu ukur 10 mL

lalu ditambahkan metanol hingga tanda batas (diperoleh larutan standar konsentrasi 10 ppm). Larutan ini dipindai panjang gelombang serapannya dengan spektrofotometer UV-Visibel pada 200-800 nm. Panjang gelombang yang memberikan serapan terbesar digunakan untuk analisis di KCKT.

3.3.4 Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi metode analisis di KCKT dilakukan pada larutan standar α -tokoferol dengan cara mengubah konsentrasi dan jenis fase gerak (asetonitril, air, dan atau metanol) hingga diperoleh hasil pengukuran yang dapat memisahkan antar komponen dan mendapat kondisi analisis yang baik, yaitu:

Tabel 3.1 Kondisi untuk optimasi kondisi analisis α -tokoferol pada KCKT

	Kondisi 1	Kondisi 2	Kondisi 3
Detektor	UV	UV	UV
Kolom	C18	C18	C18
Laju alir	1 ml/menit	1 ml/menit	1 ml/menit
Panjang gelombang	292 nm	292 nm	292 nm
Fase gerak	Air 5 : Metanol 95	Metanol 100	Asetonitril 1 : Metanol 99

Parameter KCKT yang diharapkan meliputi:

Resolusi (R_s)	: lebih dari 1,5
Kapasitas (k')	: antara 1-10
Selektifitas (α)	: lebih dari 1
Faktor <i>tailing</i> (F_t)	: antara 0,8-1,3

3.3.5 Uji Kesesuaian Sistem

Standar α -tokoferol ditimbang 100,0 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen. Dipipet 100 μ L larutan tersebut ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan metanol hingga tanda batas (diperoleh larutan standar konsentrasi 10 ppm). Larutan ini disonikasi selama 15 menit lalu disaring dengan membran filter. Diinjeksikan sebanyak 20 μ L pada KCKT menggunakan pengaturan hasil optimasi kondisi analisis yang paling baik. Dihitung nilai % simpangan deviasi relatif (RSD) dari tinggi atau luas area

puncak serta rata-rata jumlah plat teoritis; resolusi; faktor *tailing*; dan faktor kapasitas pada 5 kali injeksi. Sistem kondisi analisis sudah sesuai apabila nilai $RSD \leq 1\%$ dan nilai parameter KCKT masuk dalam rentang yang dicantumkan pada bagian 3.3.4 .

3.3.6 Validasi Metode Analisis

Metode analisis yang akan digunakan divalidasi mengacu pada ICH *guidelines* dengan parameter berikut:

a. Linieritas

Standar α -tokoferol ditimbang 100,0 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen. Dari larutan ini dipipet 10, 50, 100, 150, 200, dan 250 μ L masing-masing ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan metanol hingga tanda batas (diperoleh larutan standar konsentrasi 1, 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm). Larutan ini disonikasi selama 15 menit lalu disaring dengan membran filter. Larutan diinjeksikan ke-KCKT sebanyak 20 μ L. Luas area puncak dan nilai konsentrasi diplotkan dalam sebuah kurva regresi linier, kemudian dihitung persamaan garis dan nilai regresinya. Linieritas yang baik ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi (R^2) $\geq 0,98$.

b. Akurasi

Sampel Pameungpeuk ditimbang 500,0 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen. Dari larutan ini dipipet 100 μ L ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan larutan standar α - tokoferol 1000 ppm masing-masing sebanyak 50, 100, dan 150 μ L (diperoleh larutan sampel 50 ppm yang diadisi dengan standar 5, 10, dan 15 ppm). Larutan ini disonikasi selama 15 menit lalu disaring dengan membran filter. Kemudian larutan ini diinjeksikan 20 μ L ke dalam KCKT dan diulangi 3 kali. Hasil dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*% recovery*) yang dihitung dengan

rumus berikut ini kemudian dihitung simpangan deviasinya. Akurasi yang baik apabila nilai perolehan kembali 98-102% dan RSD < 2%.

$$\% \text{ perolehan kembali} = ((A - B) / C) \times 100$$

Ket:

A = area puncak kombinasi keduanya

B = area puncak α -tokoferol dalam sampel

C = area puncak standar α -tokoferol

c. Presisi

Standar α -tokoferol ditimbang 100,0 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen. Dari larutan ini dipipet 100 μ L ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan metanol hingga tanda batas (diperoleh larutan standar konsentrasi 10 ppm). Larutan ini disonikasi selama 15 menit lalu disaring dengan membran filter. Kemudian larutan ini diinjeksikan 20 μ L ke dalam KCKT. Pengukuran dilakukan pada hari yang sama sebanyak 6 kali pengulangan, dihitung kadarnya pada setiap pengujian lalu hitung RSD. Presisi yang baik apabila nilai RSD < 2%.

d. Spesifisitas

Standar α -tokoferol ditimbang 100,0 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen. Dipipet 100 μ L larutan tersebut ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan metanol hingga tanda batas (diperoleh larutan standar konsentrasi 10 ppm). Larutan ini disonikasi selama 15 menit lalu disaring menggunakan membran filter. Kemudian larutan ini diinjeksikan 20 μ L ke dalam KCKT. Selain itu dibuat pula larutan masing-masing sampel dengan cara

ditimbang 500,0 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen. Dipipet 100 μ L larutan tersebut ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan metanol hingga tanda batas (diperoleh larutan sampel konsentrasi 50 ppm). Larutan ini disonikasi selama 15 menit lalu disaring menggunakan membran filter. Kemudian larutan ini diinjeksikan 20 μ L ke dalam KCKT, masing-masing diulang 6 kali. Lalu dihitung rata-rata resolusinya. Spesifisitas yang baik apabila nilai resolusi standar α -tokoferol maupun sampel lebih dari 1,5.

3.3.7 Pengukuran Kadar α -tokoferol

Masing-masing sampel ditimbang 500,0 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen. Dipipet 100 μ L larutan tersebut ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan metanol hingga tanda batas (diperoleh larutan sampel konsentrasi 50 ppm). Larutan ini disonikasi selama 15 menit lalu disaring menggunakan membran filter, lalu diinjeksikan 20 μ L ke dalam KCKT. Luas area α -tokoferol yang diperoleh digunakan untuk menghitung kadarnya dengan menggunakan kurva kalibrasi dari persamaan linieritas.