

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Pengambilan dan Determinasi Bahan

Buah alpukat (*Persea americana* Mill.) yang digunakan pada penelitian ini diambil dari Kebun Percobaan Manoko Lembang Bandung. Selanjutnya dilakukan determinasi bahan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung melalui perbandingan ciri-ciri tumbuhan dengan herbarium dan data pustaka, sehingga diketahui kebenaran identitas dari tumbuhan tersebut.

4.2. Pengolahan Bahan

Pengolahan bahan meliputi pengupasan, perajangan, dan pengeringan. Pengupasan dilakukan dengan cara mengupas kulit buah alpukat kemudian bijinya dipisahkan dari daging buah alpukat tersebut. Perajangan atau pengecilan ukuran daging buah dilakukan dengan cara memotong-motong daging buah alpukat. Setelah itu dilakukan pengeringan daging buah alpukat di dalam sebuah alat pengering buatan dengan lampu 25 watt sebagai sumber panas sampai diperoleh simplisia kering.

4.3. Pemeriksaan Makroskopik dan Mikroskopik

Pada buah utuh yang masih segar (buah alpukat segar) dilakukan pemeriksaan makroskopik yang meliputi karakteristik berupa bentuk, warna, berat, dan ukuran. Pengukuran panjang dan diameter dilakukan dengan menggunakan alat ukur jangka sorong.

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap preparat irisan buah dan serbuk simplisia dengan menggunakan mikroskop untuk melihat fragmen butiran minyak dari mesokarp, sel sklerenkim, sel parenkim, dan karakteristik penanda lain yang dimiliki simplisia.

4.4. Penapisan Fitokima

4.4.1. Alkaloid

Simplisia ditempatkan ke dalam mortar dan dibasakan dengan amonia encer, kemudian ditambahkan kloroform lalu digerus kuat-kuat. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring, kemudian ke dalam campuran tersebut ditambahkan asam klorida 2 N. Campuran tersebut dikocok kuat-kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan asam dipipet dan dibagi menjadi tiga bagian.

Bagian pertama ditambahkan pereaksi Meyer kemudian diamati. Jika terjadi kekeruhan atau endapan putih itu menandakan adanya alkaloid. Bagian kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna jingga kuning, menandakan adanya alkaloid. Bagian ketiga digunakan sebagai blanko (Farnsworth, 1966:245).

4.4.2. Polifenolat

Simplisia ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Ke dalam filtrat ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida. Jika timbul warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan adanya fenolat atau terbentuk endapan coklat berarti menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966:255).

4.4.3. Saponin

Simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan air secukupnya. Lalu dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit, lalu disaring, kemudian Filtrat dibiarkan sampai dingin, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik dengan arah vertikal. Bila timbul busa setinggi kurang lebih 1 cm yang bertahan selama 10 menit menandakan adanya saponin (Farnsworth, 1966:257).

4.4.4. Triterpenoid dan Steroid

Simplisia ditempatkan di dalam mortar, digerus kemudian ditambahkan eter dan disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering. Kemudian ke dalam hasil pengeringan tersebut ditambahkan larutan pereaksi Libermann-Burchard. Terjadinya warna merah-ungu menandakan adanya triterpenoid, sedangkan adanya warna hijau-biru menandakan adanya steroid (Farnsworth, 1966:259).

4.4.5. Flavonoid

Sejumlah simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, kemudian dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2 N, selanjutnya dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Filtrat ditambahkan amil alkohol kemudian dikocok hingga timbul warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menandakan adanya flavonoid (Farnsworth, 1966:263-264).

4.4.6. Tanin

Simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, kemudian campuran tersebut dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Filtrat hasil penyaringan kemudian ditambahkan larutan gelatin 1%, bila ada endapan putih itu menandakan adanya tanin (Farnsworth, 1966:264).

4.4.7. Kuinon

Simplisia ditempatkan ke dalam tabung reaksi kemudian dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Filtrat ditambahkan natrium hidroksida 5%, terbentuknya warna kuning hingga merah menandakan adanya kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.4.8. Monoterpen dan Sesquiterpen

Simplisia dimasukkan ke dalam mortar, digerus kemudian ditambah eter dan disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan sampai kering. Selanjutnya ditambahkan larutan vanilin 10%

dalam asam sulfat pekat. Timbulnya warna-warna itu menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan sesquiterpen.

4.5. Analisis Parameter Standar Simplisia

4.5.1. Kadar Abu

Sampel yang telah digerus ditimbang kurang lebih 1-2 g, kemudian dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian ratakan. Dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, lalu didinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak hilang, maka tambahkan air panas, kemudian disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa kertas dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, lalu diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap dan timbang. Berikutnya dihitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (DepKes RI, 2000:17).

4.5.2. Kadar Air

Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, lalu dibilas lagi dengan air dan keringkan di dalam lemari pengering. Sampel yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu yang telah kering, kemudian ditambahkan toluen jenuh air sebanyak 200 ml ke dalam labu, lalu alat dihubungkan.

Kemudian labu dipanaskan dan dilakukan proses penyulingan dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap

detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen. Selanjutnya penyulingan dilanjutkan selama 5 menit, tabung penerima pendingin dibiarkan hingga suhu kamar. Jika ada tetesan air yang melekat pada pendingin tabung penerima digosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen hingga tetesan air tersebut turun. Kemudian setelah air dan toluen terpisah sempurna, volume air dibaca dan kadar air dihitung dalam persen (DepKes RI, 2000:16).

4.5.3. Susut Pengeringan

Sampel ditimbang kurang lebih 1-2 g, kemudian dimasukkan ke dalam cawan penguap yang telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan ditara, lalu permukaan simplisia diratakan, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap penimbangan, cawan didinginkan ke dalam deksikator hingga suhu kamar (DepKes RI, 2000:13).

4.6. Ekstraksi Bahan

Ditimbang 50 gram simplisia, kemudian dimasukkan ke dalam tabung berpori (dibuat dari kertas saring dengan ukuran yang sesuai), lalu ditempatkan di bagian dalam alat soxhlet. Bagian bawah soxhlet disambungkan dengan labu destilasi yang berisi cairan pelarut (n-heksan) dan batu didih, sedangkan bagian atas soxhlet disambungkan dengan

kondensor. Perbandingan antara simplisia dan pelarut yaitu 1 : 4. Berikutnya aliran air yang masuk ke kondensor dibuka, lalu pemanasnya dinyalakan pada suhu 70°C. Setelah itu proses ekstraksi dilakukan hingga tetesan ekstrak tidak berwarna lagi, kemudian didinginkan dan disimpan di dalam wadah penampung.

4.7. Pemurnian Minyak

4.7.1. Netralisasi

20-30 g minyak dimasukkan ke dalam beker gelas 100 mL, kemudian ditambahkan larutan NaOH 14,37%. Campuran dipanaskan pada suhu 60°C di atas *hotplate* selama 1 jam sambil diaduk. Sabun yang terbentuk kemudian dipisahkan dengan cara sentrifuga dengan kecepatan 2000 rpm, lalu supernatannya diambil. Minyak yang diperoleh kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat berwarna gelap, kemudian ke dalam minyak tersebut ditambahkan tokoferol (Maulana, 2013:39).

4.8. Analisis Parameter Mutu Minyak

4.8.1. Organoleptis

Minyak dianalisis secara organoleptis, yang meliputi bau, warna yang dilihat secara kasat mata.

4.8.2. Penetapan bilangan asam

1 g sampel minyak dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian ditambahkan 50 ml etanol 95%. Campuran tersebut kemudian

dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk selama 10 menit. Setelah itu kemudian dititrasi dengan NaOH 0,1 N dengan ditambahkan 3 tetes indikator fenolptalein sampai terbentuk warna merah muda (Maulana, 2013:38).

4.8.3. Penetapan bilangan peroksida

2 g sampel minyak dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian ditambahkan 12 ml pelarut yang terdiri dari 60% asam asetat glasial dan 40% kloroform lalu dikocok sampai semua minyak larut. Kemudian ke dalam campuran tersebut ditambahkan 0,2 ml KI jenuh (sebagai katalisator analisis) dan didiamkan selama 2 menit pada ruang gelap sambil sesekali dikocok. Ke dalam larutan ditambahkan 12 ml aquadest, setelah itu ditambahkan indikator amilum hingga terbentuk warna ungu. Iod yang dilepaskan selanjutnya dititrasi dengan natrium tiosulfat 0,01 N. Pengerjaan yang sama dilakukan pada blanko (Maulana, 2013:38).

4.8.4. Penetapan bilangan penyabunan

Ditimbang 4-5 gram minyak, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Setelah itu ditambahkan perlahan-lahan 50 ml NaOH 0,5 N dengan pipet. Lalu dipanaskan di atas *hotplate* sampai terbentuk sabun dengan sempurna selama 30 menit, selanjutnya larutan didinginkan. Berikutnya larutan ditambahkan 3 tetes indikator fenolptalein, dan dititrasi dengan HCl 0,5 N sampai warna merah muda menghilang. Pengerjaan dilakukan juga pada blanko (Ketaren, 2008:49-50).

4.8.5. Bobot Jenis

Disiapkan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer air. Piknometer diisi minyak, jika kelebihan minyak dibuang dan timbang. Bobot piknometer kosong diperoleh dari penimbangan bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis minyak adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot minyak dengan bobot air (DepKes RI, 2000:14).

4.9. Transesterifikasi Asam Lemak

2 ml minyak dimasukkan ke dalam labu refluks, lalu ditambah 30 ml metanol pro analisis, kemudian secara hati-hati ditambahkan 1 ml NaOH 6 N. Setelah itu dipanaskan selama 2 jam, lalu didinginkan. Setelah dingin larutan dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambah dengan 20 ml n-heksan. Lapisan n-heksan diambil kemudian dipekatkan menggunakan evaporator sampai pelarut menguap.

4.10. Pemantauan FAME Hasil Transterifikasi

Plat KLT GF₂₅₄ disiapkan, kemudian minyak alpukat mentah atau matang murni, asam lemak, dan minyak hasil proses transesterifikasi ditotolkan dengan jarak tertentu. Plat KLT yang telah ditotolkan kemudian dielusi di dalam *chamber*, dengan menggunakan fase gerak n heksana : etil asetat : asam asetat (90 : 10 : 1) (Maulana, 2013:40).

4.11. Analisis FAME menggunakan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa

FAME disiapkan untuk analisis dengan instrumen kromatografi gas. FAME terlebih dahulu diencerkan sampai 40 kalinya. Selanjutnya larutan disaring dengan menggunakan *filter holder*. Filtrat siap untuk diinjeksikan.

Instrumen kromatografi gas spektroskopi massa (KG-SM) disiapkan dengan pengaturan sistem sesuai dengan kondisi ideal analisis yaitu suhu injektor 280°C, suhu detektor 290°C. Sistem pemisahan diatur dengan suhu awal ditetapkan sebesar 60°C, ditahan selama 2 menit, kemudian dinaikkan dengan kecepatan 8°C per menit hingga dicapai suhu 290°C. Jadi total lamanya waktu analisis adalah 30 menit.