

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Prinsip Dasar Penelitian

Analisis ekstrak rumput laut *Gracilaria sp* dilakukan dengan metode isolasi ekstraksi pelarut dan kromatografi lapisan tipis (KLT) dengan fasa diam silika gel GF-254. Metode spektrofotometri UV (λ 200-400 nm) dalam pelarut etanol 95 % dan spektrofotometri IR ($\bar{\nu}$ 4000-667 cm^{-1}) dalam pelarut kloroform digunakan untuk identifikasi awal.

3.2. Bahan Dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan-bahan Penelitian

- Rumput laut *Gracilaria sp*
- Metanol teknis dan p.a.
- Etil asetat teknis dan p.a.
- Kloroform teknis dan p.a.
- n-Heksana teknis dan p.a.
- Etanol 95 % p.a.
- Aseton p.a.
- Aquadess

3.2.2 Alat-alat Penelitian

- Perkolator
- Rotary evaporator
- Corong pemisah
- Plat KLT GF-254

- Pipa kapiler
- Gelas ukur
- Tabung reaksi
- Gelas beaker
- Gelas KLT
- Pipet tetes
- Corong gelas
- Botol semprot
- Aluminium foil
- Kertas saring
- Penggaris
- Lampu UV
- Sentrifuga
- Spektrofotometer UV Shimadzu
- Spektrofotometer IR Shimadzu

3.3. Metode Kerja

3.3.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian rumput laut *Gracilaria sp* dikumpulkan dari laut sekitar Jepara pada pertengahan Juni 1997.

3.3.2 Determinasi Sampel

Sampel rumput laut segar diambil dan diamati ciri-ciri morfologinya, kemudian dicocokkan dengan contoh rumput laut yang ada di laboratorium Biologi MIPA UNDIP, dan dibandingkan terhadap literatur.

3.3.3 Penyiapan Sampel Rumput Laut *Gracilaria sp*

Sampel rumput laut *Gracilaria sp* basah dipisahkan dari tanaman lain, dicuci dengan air bersih dan dikeringkan tanpa sinar matahari langsung. Sampel kering (500 gram) kemudian dipotong kecil-kecil dan diserbukkan menggunakan blender.

3.3.4 Pembuatan Pereaksi

- Pembuatan pereaksi Lieberman-Burchard

Terdiri dari anhidrid asam asetat dan asam sulfat pekat yang disimpan secara terpisah

- Pembuatan pereaksi Wagner

Dalam 10 ml aquades dilarutkan iodium 2,54 gram dan kalium iodida 2 gram, kemudian larutan ini diencerkan dengan aquades sampai volume 100 ml. Setelah disaring disimpan dalam botol gelap

- Pembuatan pereaksi Meyer

Merkuri klorida sebanyak 1,36 gram ditambahkan pada larutan 5 gram kalium iodida dalam 10 ml aquades. Campuran keduanya diencerkan sampai 100 ml dengan aquades. Larutan disimpan dalam botol gelap

- Pembuatan larutan FeCl_3 1 %

Ditimbang 1 gram FeCl_3 dan ditempatkan dalam labu takar 100 ml dan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas

3.3.5 Analisis Skrining Fitokimia Rumput Laut

Gracilaria sp

Dilakukan analisis skrining fitokimia terhadap rumput laut *Gracilaria sp*, meliputi analisis golongan triterpenoid, steroid, alkaloid, saponin dan fenol.

- Pengujian adanya triterpenoid dan steroid

Sampel 20 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dikocok dengan kloroform selama 15 menit. Larutan hasil ekstrak diambil 10 tetes dan ditempatkan pada plat tetes dibiarkan sampai kering. Setelah itu ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrid dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditandai dengan warna merah ungu, sedangkan warna biru menunjukkan adanya senyawa steroid.

- Pengujian alkaloid

Sampel mula-mula dihaluskan dan ditambahkan kloroform secukupnya sambil tetap dihaluskan. Selanjutnya ditambahkan amonium hidroksida dalam kloroform dan dipisahkan ke dalam tabung reaksi dengan cara disaring. Filtrat ditambah dengan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes dan dikocok. Cairan bagian atas yang merupakan asam sulfat dan alkaloid diambil dengan pipet dan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi yang lain. Ke dalam kedua tabung reaksi tersebut ditambahkan pereaksi Meyer dan Wagner. Hasil positif jika diperoleh endapan putih

dengan pereaksi Meyer dan endapan coklat dengan pereaksi Wagner.

- Pengujian saponin

Sampel 2 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan air sampai seluruh sampel terendam air, lalu dididihkan dan setelah dingin dikocok kuat-kuat. Adanya saponin ditunjukkan oleh adanya busa yang stabil selama 30 menit.

- Pengujian fenol

Sampel ditambah dengan aquades dan dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan dipipet, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah larutan FeCl_3 1%. Adanya senyawa fenol ditandai dengan perubahan warna dari hijau sampai hitam.

3.3.6 Ekstraksi Dan Isolasi Sampel

Sebanyak 500 gram sampel serbuk rumput laut *Gracilaria sp* direndam dalam metanol pada suhu kamar selama 24 jam, perendaman diulang 4 kali. Ekstrak metanol disaring dan pelarut dihilangkan menggunakan rotari evaporator menghasilkan ekstrak hijau gelap.

Ekstrak metanol selanjutnya diekstraksi partisi menggunakan corong pemisah dengan pelarut metanol : n-heksana. Fraksi metanol diekstraksi lagi dengan kloroform, kemudian dengan etil asetat sehingga diperoleh 4 fraksi yaitu : fraksi n-heksana, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol.

Masing-masing fraksi dipekatkan dengan rotari evaporator, untuk selanjutnya dilakukan pemisahan senyawa menggunakan KLT dengan variasi berbagai pelarut organik (polar dan non polar) sampai didapatkan pemisahan yang bagus. Noda dianalisa dengan bantuan lampu UV (λ 254).

Noda senyawa diambil dengan cara dikerok dan dilarutkan dalam etanol 95 %, kemudian disentrifugasi selama 5 menit dan disaring. Homogenitas (kemurnian) senyawa dilihat menggunakan KLT pada beberapa sistem pelarut yang berbeda. Jika didapatkan noda tunggal dalam berbagai eluen maka diharapkan bahwa senyawa tunggal.

3.3.7 Identifikasi Awal Senyawa Tabir Surya

Selanjutnya senyawa kimia hasil isolasi dianalisis dengan spektrofotometer UV pada λ 200-400 nm dan spektrofotometer IR pada 4000-667 cm^{-1} .

Sampel hasil isolasi dengan KLT dilarutkan dalam etanol 95 %, kemudian dimasukkan dalam kuvet dan disinari dengan sinar UV pada λ 200-400 nm. Spektra yang dihasilkan menunjukkan serapan maksimal (λ maksimal) yang diserap senyawa ekstrak *Gracilaria sp.*

Senyawa kimia yang berkarakter tabir surya memiliki serapan maksimal pada λ sekitar 280-320 nm. Selanjutnya sampel dilarutkan dalam kloroform dan diteteskan ke dalam alat spektrofotometer IR dengan pelarut sebagai pembanding sehingga dihasilkan grafik %T versus $\bar{\nu}$ yang memberikan informasi adanya gugus fungsional dalam senyawa tersebut.