

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Sampel, Alat dan Bahan

3.1.1 Sampel

Sampel berupa daun pare alas (*Momordica charantia*, Linn) yang diambil di desa Wonolopo, Kecamatan Mijen, Semarang.

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut :

- n- heksana teknis dan p.a.
- Kloroform teknis dan p.a.
- Etil asetat teknis dan p.a.
- Metanol teknis dan p.a.
- Aquadest
- Natrium klorida
- Silika gel untuk kromatografi kolom vakum
- Plat KLT
- Telur *Artemia salina*
- Kertas saring

3.1.3 Alat

- 1 set alat soxhlet
- 1 set alat kromatografi kolom vakum
- Rotary evaporator

- Vial
- Gelas beaker
- Gelas ukur
- Erlenmeyer
- Pipet tetes
- Pipa kapiler
- Corong gelas
- Pengaduk
- Spatula
- Tabung reaksi
- Lampu UV
- Penangas
- Plat tetes
- Mikro pipet

3.2 Metode Kerja

3.2.1 Persiapan Sampel

Tanaman pare alas yang diperoleh dari hutan di Mijen, daunnya dipisahkan dari batang, bunga dan buahnya. Kemudian daun tersebut dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering daun tersebut dihaluskan sampai berupa serbuk.



3.2.2 Analisa Skrining Fitokimia Daun Pare Alas

Dilakukan analisa skrining fitokimia terhadap daun pare alas, meliputi analisa golongan senyawa triterpenoid, steroid, saponin, fenol dan alkaloid.

3.2.2.1 Analisa Senyawa Triterpenoid dan Steroid

Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan kloroform sebanyak 5 ml. Selanjutnya dipanaskan sebentar di atas penangas air sambil dikocok-kocok, kemudian didinginkan. Filtrat dipipet dan ditempatkan pada plat tetes, kemudian ditambahkan sedikit kloroform (10 tetes) dan biarkan sampai kering. Kemudian ditambahkan 5 tetes anhidrida asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Analisa ini untuk menguji senyawa-senyawa triterpenoid dan steroid dimana jika terbentuk warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan terbentuknya warna biru menunjukkan adanya steroid. (17, 18)

3.2.2.2 Analisa Senyawa Saponin

Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan 10 ml aquadest dan dididihkan selama 2-3 menit, kemudian didinginkan. Kocok kuat-kuat selama 10 menit. Timbulnya busa stabil selama 10 menit menunjukkan adanya saponin. (17, 18)

3.2.2.3 Analisa Senyawa Fenol

Sampel ditambah dengan air dan dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan larutan

FeCl_3 1% ke dalamnya. Adanya senyawa fenol ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari hijau sampai hitam. ^(17, 18)

3.2.2.4 Analisa Senyawa Alkaloid

Sampel sebanyak 4 gram dihaluskan dalam lumpang porselen, kemudian ditambahkan kloroform secukupnya. Selanjutnya ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes dan dikocok dengan teratur, kemudian ditambahkan NH_4OH ke dalamnya. Cairan bagian atas dipipet dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Ke dalam tabung ditambahkan pereaksi Mayer. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih. ^(17, 18)

3.2.3 Pembuatan Kromatografi Kolom Vakum

Kolom kromatografi vakum dicuci dengan detergen, kemudian dibilas dengan aquadest, dikeringkan dan dibilas dengan pelarut n-heksan. Alat kromatografi kolom vakum dipasang dan dihubungkan dengan vakum kondensor. Sebagai adsorben (fasa diam) digunakan silika gel untuk KLT yang telah diaktifkan pada suhu 110°C . Setelah dingin adsorben dimasukkan ke dalam kolom kromatografi. Adsorben dielusi dengan n-heksan sebanyak 100 ml, kemudian dipadatkan lagi dengan cara yang sama. Hal ini diulang beberapa kali sampai adsorben menjadi padat.

3.2.4 Ekstraksi Sampel

Serbuk daun pare alas diekstraksi dengan pelarut etil asetat menggunakan soxhlet. Ekstraksi dihentikan setelah bahan terekstrak sempurna. Filtrat hasil

ekstraksi, selanjutnya diuapkan dengan alat rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak pekat.

3.2.5 Analisa Pendahuluan

Filtrat yang pekat tersebut dianalisa lebih lanjut dengan menggunakan KLT dengan berbagai eluen, yaitu n-heksan, kloroform, etil asetat, metanol dan campuran dua pelarut. Pemilihan eluen diharapkan telah mewakili tingkat-tingkat kepolaran. Untuk mengetahui bercak noda digunakan lampu ultra violet. Dari uji KLT ini dapat diketahui jumlah komponen yang ada dalam ekstrak pekat dan dapat diketahui pelarut yang dapat memberikan pemisahan senyawa yang terbaik

3.2.6 Pemisahan dengan Kromatografi

Sebanyak 8 gram ekstrak pekat dilarutkan dalam sedikit kloroform dan ditambahkan silika gel G 60 sampai semua sampel terserap, kemudian dimasukkan ke dalam kolom vakum yang telah disiapkan dan dielusi dengan berbagai pelarut (n-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol) berdasarkan kenaikan kepolaran. Fraksi yang keluar ditampung dalam botol-botol kaca. Dari seluruh fraksi yang diperoleh dilakukan uji KLT, yang menghasilkan noda yang sama digabung menjadi satu.

3.2.7 Pemurnian

Terhadap fraksi-fraksi yang diperoleh dilakukan proses pemurnian dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai, dimana rekristalisasi ini diulang beberapa kali sampai diyakini didapat senyawa yang murni. Untuk menguji kemurniannya dilakukan uji KLT 1 arah dan 2 arah.

3.2.8 Analisa Senyawa Hasil Isolasi

3.2.8.1 Analisa Golongan Senyawa

Untuk mengetahui golongan senyawa dari senyawa hasil isolasi, maka senyawa hasil isolasi dianalisa golongan senyawanya yaitu dengan menggunakan uji golongan senyawa. Uji golongan yang dilakukan adalah uji golongan untuk senyawa : triterpenoid / steroid, senyawa fenol dan alkaloid.

3.2.8.2 Analisa Titik Leleh

Sejumlah senyawa hasil isolasi ditempatkan pada plat kaca, kemudian plat kaca tersebut ditempatkan pada alat Fisher John Melting Point dan diamati suhunya sampai senyawa tersebut meleleh.

3.2.8.3 Uji Aktivitas Biologis

Uji aktivitas biologis yang digunakan adalah Brine Shrimp Lethality Test dengan menggunakan *Artemia salina*. Adapun tahapan uji aktivitas ini adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan air laut sintetis.

3.8 gram NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquades kemudian disaring.

2. Penetasan telur.

Air laut sintetis yang sudah disiapkan ditempatkan dalam tanki kecil (tanki penetasan). Kemudian telur *Artemia salina* dimasukkan selama 24 jam sampai telur-telur tersebut menetas.

3. Pembuatan variasi konsentrasi.

4,2 mg dari senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam 3 ml kloroform sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1400 ppm. Kemudian dari larutan tersebut diambil 500 μL , 200 μL dan 50 μL kemudian masing-masing diencerkan menjadi 5 ml, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 140 ppm, 57 ppm dan 17 ppm.

4. Penentuan L_{D50}

Masing-masing larutan di atas (3) ditempatkan dalam mikroplate, kemudian diberi 30 *Artemia salina* dan setelah 24 jam diamati jumlah *Artemia salina* yang hidup dan mati. Data yang diperoleh diolah dengan suatu program komputer (Bliss Method) untuk menentukan L_{D50} .⁽⁶⁾

3.2.8.4 Analisa Spektrum Ultra Violet

Dilakukan analisa dengan menggunakan spektrofotometer ultra violet dimana sejumlah kecil senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam kloroform , kemudian kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan disinari dengan sinar UV. Spektrum yang dihasilkan menunjukkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh senyawa tersebut.

3.2.8.5 Analisa Spektrum Infra Merah

Dilakukan analisa dengan menggunakan spektrofotometer infra merah terhadap senyawa hasil isolasi. Dimana spektra yang dihasilkan menunjukkan gugus-gugus fungsi dan jenis-jenis ikatan dalam senyawa tersebut.