

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1. Sampel

Sampel berupa daun tembakau terinfeksi virus mozaik yang diperoleh dari desa Parakan, Temanggung, Jawa Tengah.

3.1.2. Bahan

- Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang berkualitas teknis yaitu :n- heksan, metanol, eter, kloroform.
- asam sitrat
- amonium hidroksida
- magnesium sulfat anhidrid
- asam sulfat pekat
- asam asetat anhidrid
- kalium iodida
- merkuri klorida
- feri klorida
- aquades
- plat KLT
- silika gel G₆₀
- DMSO (Dimetil sulfoksida)

- Natrium klorida
- Artemia salina

3.1.3. Alat

- gelas ukur 5 ml, 25 ml dan 100 ml
- erlenmeyer 125 ml
- labu takar 100 ml
- pengaduk
- corong
- corong pisah
- beaker glass
- spatula
- pipet tetes
- perkolator
- chamber KLT
- kromatografi kolom 1 set
- statif 1 set
- pemanas
- botol 10 ml 50 buah
- lampu UV spectroline
- oven
- pH-meter
- Electrothermal I A 9000 series



- UV-Vis Milton Roy Spectronic 3000
- IR SHIMADZU FTIR-820 IPC
- MS SHIMADZU QP-5000
- MS Finnigan Mat type/seri GCQ
- Vial
- Kotak penetas
- mikroplate
- mikropipet
- mikrotip

3.2. Metode Kerja

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang, analisa spektroskopi UV, IR dan MS dilakukan di laboratorium Kimia Organik Universitas Gadjah Mada dan di BATAN Serpong, Jakarta. Uji aktivitas dengan "Brine Shrimp Lethality" dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam ITB Bandung.

3.2.1. Pembuatan Pereaksi

Pereaksi yang dibuat untuk identifikasi golongan senyawa adalah sebagai berikut :

- **Pembuatan Pereaksi Lieberman-Burchad**

Terdiri dari anhidrida asam asetat dengan asam sulfat pekat yang disimpan secara terpisah.

- **Pembuatan Pereaksi Meyer**

Merkuri (II) klorida sebanyak 1,36 gram ditambahkan pada larutan 5 gram kalium iodida (KI) dalam 10 ml aquades. Campuran keduanya diencerkan menjadi 100 ml dengan aquades. 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 dengan tanda batas.

3.2.2. Pembuatan Kromatografi Kolom

Alat kolom kromatografi dengan diameter tertentu dicuci dengan detergen, dibilas dengan air bersih.

Sebagai fasa diam digunakan silika gel G_{60} yang diaktifkan pada suhu 110°C dan sebagai fasa gerak digunakan metanol.

Alat dipasang vertikal, bagian bawah kolom diberi kapas guna menahan fasa diam. Kemudian dimasukkan fasa diam yang terlebih dahulu dibuat bubuk dengan pelarut metanol sedikit demi sedikit sampai menjadi padat.

3.2.3. Uji Pendahuluan Golongan Senyawa terhadap Daun Tembakau Terinfeksi Virus Mozaik

Sebanyak 1 gram serbuk daun tembakau diekstraksi dengan metanol. Terhadap hasil ekstraksi dilakukan uji pendahuluan golongan senyawa meliputi analisa golongan triterpenoid, steroid, alkaloid, saponin dan fenol.

- **Pengujian adanya triterpenoid dan steroid**

Sampel (ekstrak metanol) dimasukkan dalam tabung reaksi, setelah itu ditambahkan 10 tetes anhidrida asam asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditandai dengan perubahan warna merah ungu, sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.

- **Pengujian alkaloid**

Sampel ditambahkan reagen Meyer. Hasil positif diperoleh jika timbul endapan putih.

- **Pengujian saponin**

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan air dan dididihkan, setelah dingin dikocok kuat-kuat. Adanya saponin ditunjukkan oleh adanya busa yang stabil selama 30 menit.

- **Pengujian fenol**

Sampel ditambah dengan aquades kemudian dipanaskan hingga mendidih, air rebusan dimasukkan kedalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan larutan FeCl_3 1%. Adanya senyawa fenol ditandai adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam.

3.2.4. Perlakuan Awal Sampel

Daun dari tanaman tembakau yang terinfeksi virus mozaik dipotong halus dan dikeringkan. Sebanyak 1 kg sampel terlebih dahulu diekstraksi dengan n-heksan untuk membebaskan lemaknya. Kemudian terhadap ampas diekstraksi kembali dengan pelarut metanol menggunakan perkolator. Hasil ekstrak tersebut diuapkan dengan *rotary evaporator*. Setelah diuapkan dengan *rotary evaporator*

diperoleh filtrat dan padatan. Kemudian dipisahkan antara filtrat dan padatan untuk analisis lebih lanjut.

3.2.4.1. Analisis Filtrat

Terhadap filtrat diambil senyawa alkaloidnya. Senyawa alkaloid umumnya bersifat basa, maka dapat digaramkan dengan penambahan asam. Sedangkan untuk mengambil senyawa-senyawa non-alkaloid, larutan asam tersebut dicuci dengan eter. Larutan asam dibasakan dan diekstrak dengan kloroform sehingga diperoleh alkaloid total.²⁰ Terhadap krude alkaloid total diuji aktivitasnya dengan metode “Brine Shrimp Lethality”.

Terhadap krude ekstrak alkaloid dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan berbagai pelarut seperti : n-heksan, kloroform, eter, metanol, dan kombinasinya dan selanjutnya dilakukan pemisahan komponen dengan kromatografi kolom.

Pemisahan dengan kromatografi kolom dilakukan dengan pelarut metanol, sehingga diperoleh beberapa fraksi. Fraksi yang diambil adalah fraksi yang berfluoresensi dengan lampu UV. Terhadap fraksi ini dilakukan pemurnian dengan menambahkan karbon aktif untuk menghilangkan tar yang ada. Fraksi ini selanjutnya disebut senyawa I. Terhadap senyawa I dilakukan kembali uji golongan alkaloid dengan reagen Meyer. Hasil positif diperoleh jika timbul endapan putih. Kemudian ditentukan strukturnya dengan MS dan diuji aktivetasnya dengan metode “Brine Shrimp Lethality”.

3.2.4.2. Analisis Padatan

Padatan yang diperoleh dicuci dengan n-heksan dan kloroform sehingga diperoleh kristal. Kristal ini kemudian direkristalisasi dengan metanol beberapa kali sehingga diperoleh kristal murni. Kristal ini selanjutnya disebut senyawa II. Terhadap senyawa II ini dilakukan uji golongan senyawa alkaloid, ditentukan titik lelehnya dan ditentukan struktur molekulnya dengan spektroskopi UV, IR dan spektroskopi massa.

3.2.5. Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

- Uji Titik Leleh

Sampel dimasukkan ke dalam pipa kapiler kemudian diletakkan didalam *electrothemat* I A series 9000 dan harga titik leleh ditunjukkan oleh suhu yang tercantum pada alat tersebut (kenaikkan 0,1 ° C).

- Analisis Spektroskopi UV

Sampel dilarutkan dalam pelarut etanol kemudian dimasukkan dalam kuvet dan disinari dengan sinar UV. Spektra yang dihasilkan menunjukkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh senyawa.

- Analisis Spektra IR

Sebanyak 1 mg sampel dibuat pelet dengan KBr. Pelet yang dihasilkan dimasukkan dalam alat Infra Merah dan dihasilkan grafik antara % T versus bilangan gelombang yang memberikan informasi adanya gugus fungsional dalam senyawa tersebut. Sedangkan untuk sampel yang berbentuk cairan sampel ditambahkan nujol yang kemudian dimasukkan dalam alat Infra Merah.

- Analisis Spektroskopi Massa

Sampel sebanyak 1 mg dimasukkan dalam alat spektrofotometer massa, spektra yang dihasilkan berupa grafik antara limpahan relatif dari masing-masing pecahan versus massa per muatan (m/e).

3.2.6. Uji Bioassay dengan Metode “Brine Shrimp Lethality”

- Pembuatan air laut

3,8 gram natrium klorida dilarutkan dalam 100 mL aquadest kemudian disaring.

- Penetasan telur

Air laut yang telah disiapkan ditempatkan dalam tanki penetas. Kemudian *Artemia salina* dimasukkan dalam tanki selam 24 jam sampai telur-telur menetas.

- Pembuatan variasi konsentrasi

1 mg dari masing-masing fraksi krude ekstrak dilarutkan dalam 150 μ L DMSO (Dimetil sulfoksida). Kemudian 150 μ L larutan tersebut diencerkan dengan 100 μ L aquades sehingga diperoleh konsentrasi 4000 ppm. Selanjutnya dari 4000 ppm dibuat larutan dengan konsentrasi 1000 ppm, 100 ppm dan 10 ppm.

- Penentuan L_{D50} dengan “Bliss Method”

100 μ L masing-masing larutan diatas ditempatkan dalam mikropate, kemudian 30 *Artemia salina* dan setelah 24 jam diamati jumlah yang hidup dan mati. Data yang diperoleh dengan program “Basil” untuk menentukan L_{D50} .

Bagan kerja dapat dilihat pada lampiran I