

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini, yang pada prinsipnya memiliki tujuan eksplorasi senyawa bahan alam dari kulit biji tanaman *Anacardium occidentale* Linn, dilakukan pada 3 laboratorium, yaitu :

1. Isolasi senyawa bioaktif serta uji aktivitas ikan guppy di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA UNDIP.
2. Analisis dengan spektrometer UV, IR, GC-MS di Laboratorium Kimia Instrument Jurusan Kimia FMIPA UGM, Yogyakarta.
3. Uji aktivitas biologis *Brine Shrimp Lethality Test* di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Jurusan Kimia, ITB Bandung.

3.1. Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1. Sampel

Sampel dari penelitian ini adalah serbuk kulit biji jambu mete (*Anacardium occidentale* Linn) yang sudah dimaserasi fraksi n-heksannya, yang kemudian di ekstrak lagi menggunakan pelarut metanol.

Bahan kulit biji jambu mete (*Anacardium occidentale* L) diambil dari Kecamatan Purwantoro, Kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah. Kulit biji ini kemudian di keringkan dan diblender sehingga menjadi serpihan kecil.

3.1.2 Bahan

- Pelarut Metanol, n-heksan, Etil Asetat, Kloroform,
- Larutan Timbal asetat 5 % dalam etanol.
- Larutan Ferri klorida 5 % dalam etanol.
- Asam asetat anhidrat
- Asam sulfat pekat
- Asam klorida pekat
- Amonium Hidroksida
- Reagen Meyer
- Logam Magnesium
- Plat KLT silikagel G 60 F 254
- Silikagel G 60
- Aquadest
- Garam Laut (*salt sea*)
- Telur udang *Arthemia salina* L
- Ikan Guppy

3.1.3. Alat

Peralatan gelas yang digunakan adalah peralatan yang biasa digunakan di Laboratorium, antara lain gelas ukur, gelas arloji, gelas Bekker, corong gelas, pengaduk, spatula, pipet tetes, alat perkolasi, alat kromatografi kolom vakum dan kolom biasa. Selain alat gelas, digunakan juga "Rotary evaporator" Buchi Switserland,

“Melting Point “ Fisher John, Lampu UV dengan spesifikasi “Long Wave” (366 nm) dan “ Short Wave” (254 nm), dan spektrofotometer FTIR merk Shimadzu model 8201 PC, Spektrofotometer UV merk Milton Roy Spectronic 3000 Array, GC-17A Shimadzu dan Mass Spektro merk Shimadzu model QP-5000.

3.2. Cara Kerja

3.2.1. Identifikasi Tanaman Target

Identifikasi tanaman target yang akan dijadikan sampel dalam penelitian senyawa aktif fraksi metanol kulit biji jambu mete (*Anacardium occidentale L*) adalah dengan menggunakan penelusuran literatur berdasarkan ciri-ciri tanaman.

3.2.2. Pembuatan Ekstrak

Serpihan kulit biji jambu mete yang sudah di maserasi fraksi n-heksannya yang sebelumnya mempunyai berat 1 kg, diekstraksi dengan cara perkolasi-maserasi menggunakan pelarut metanol, hasil kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator, hingga menghasilkan ekstrak kasar berupa padatan hitam tetapi tidak keras yang berwarna coklat tua sebanyak 31,43 gram. Pada ekstrak kasar ini kemudian dilakukan pengujian bioaktifitas menggunakan ikan guppy dan *Brine Shrimp Lethality Test*.

3.2.3. Pemeriksaan Golongan Senyawa Terhadap Ekstrak Kasar Metanol. ⁽²¹⁾

a. Pengujian adanya Alkaloid

Sampel kira-kira 4 gram dihaluskan dalam lumpang porselen, kedalamnya ditambahkan kloroform secukupnya dan dihaluskan, lalu ditambahkan 10 ml NH_4OH Filtrat disaring dan ditambahkan H_2SO_4 2N sebanyak 10 tetes lalu dikocok. Cairan lapisan atas yang terbentuk kemudian dipipet dan diletakkan dalam plat tetes, kemudian dilakukan tes dengan reagen Wagner atau Meyer. Apabila terbentuk endapan coklat dengan penambahan reagen wagner atau endapan putih dengan reagen Meyer maka uji Alkaloid positif.

b. Pengujian adanya triterpenoid dan steroid

Sampel kira-kira 100 mg diekstrak dengan kloroform, setelah itu ditambahkan asam asetat anhidrat 5 tetes dan satu tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna biru berlin menunjukkan adanya steroid, sedangkan bila terbentuk warna merah ungu menunjukkan adanya triterpenoid.

c. Pengujian adanya senyawa fenol

Sampel ditambahkan dengan air suling, kemudian dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan disaring dan diletakkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan larutan FeCl_3 1%. Adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam menunjukkan adanya hasil yang positif. Kalau ekstrak ditambahkan logam Magnesium dan HCl pekat menghasilkan warna merah, berarti uji flavonoid juga positif.

d. Uji saponin

Sampel kira-kira 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan air sehingga seluruh sampel terendam, dan dididihkan selama 2-3 menit. Setelah dingin dikocok kuat-kuat. adanya buih yang stabil selama 30 menit menunjukkan adanya saponin.

3.2.4 Isolasi dan Pemurnian Kandungan Ekstrak kasar

Sebelum dilakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan awal dengan KLT, sehingga diidentifikasi banyaknya jenis senyawa minimal yang terkandung dalam ekstrak kasar metanol menggunakan eluen yang paling baik.

Menggunakan eluen hasil KLT dilakukan fraksinasi dengan metode kromatografi kolom vakum dengan fase diam silikagel G 60. Hasil kromatografi kolom vakum ditampung dalam botol-botol kecil ± 10 ml. Fraksi ini kemudian diuji lagi dengan menggunakan KLT. Fraksi dengan jumlah noda dan harga Rf yang sama digabungkan menjadi satu botol dan diuapkan. Pada tiap fraksi kemudian dilakukan pengujian bioaktivitas, fraksi yang paling aktif kemudian dilanjutkan dengan pemurnian dengan menggunakan metoda kristalisasi dan rekristalisasi. Kristal hasil isolasi kemudian diuji dengan KLT.

Untuk mengetahui struktur kristal hasil isolasi, dilakukan analisa spektostroskopi UV, IR dan MS serta pengujian titik leleh kristal.

3.2.5 Uji Aktivitas

Pengujian aktivitas terhadap ekstrak kasar, fraksi hasil kolom dan kristal hasil isolasi dilakukan dengan dua cara, yaitu menggunakan ikan guppy dan metoda *Brine Shrimp Lethality*.

Pengujian dengan ikan guppy dilakukan untuk segera mengetahui keaktifan dalam waktu yang cepat, hasil pengujian dengan ikan guppy akan dibandingkan dengan hasil pengujian metoda *Brine Shrimp Lethality*.

3.2.5.1 Pengujian Menggunakan ikan guppy

1. Larutan senyawa yang akan diuji dibuat dengan konsentrasi bervariasi kemudian dimasukkan ke dalam gelas Bekker 100 ml, di mulai dari konsentrasi yang mematikan semua ikan sampai konsentrasi yang paling sedikit mematikan ikan.
2. Sepuluh ekor ikan guppy yang sudah dipuasakan selama semalam dicari yang berukuran sama kemudian dimasukkan ke dalam setiap larutan tadi serta larutan blanko.
3. Ikan guppy diamati dan hitung yang mati setelah 1 jam.
4. Nilai $L_C 50$ dihitung dengan rumus.

3.2.5.2 *Brine Shrimp Lethality Test*

1. Larutan air laut untuk penetasan telur udang dibuat dengan melarutkan 3,8 gram garam laut ke dalam 100 ml aquadest.

2. Tempat penetasan telur diisi dengan air laut (hasil buatan) secukupnya.
3. Telur udang *Artemia salina* L dimasukkan pada bagian sisi gelap (tertutup) dari tempat penetasan.
4. Setelah selama 2 x 24 jam, udang yang menetas diamati.
5. Senyawa yang akan diuji dibuat dengan berbagai variasi konsentrasi dalam pelarutnya dengan pengulangan 3 kali untuk setiap konsentrasi senyawa serta blanko dalam vial (5 ml).
6. Ke dalam setiap vial yang berisi larutan senyawa serta larutan blanko dimasukkan 8 sampai 15 ekor udang.
7. Jumlah udang yang mati untuk setiap vial dihitung setelah 24 jam.
8. Harga $L_C 50$ senyawa yang diuji dihitung menggunakan komputer.

3.2.6. Analisa Spektroskopi

3.2.6.1. Spektroskopi UV

Pada pengujian dengan spektrometer UV, kristal dilarutkan dalam pelarut n-Heksana, kemudian diukur panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi maksimum sehingga diketahui transisi elektron dari orbital yang terjadi.

3.2.6.2. Spektroskopi IR

Pengujian spektrometer IR dilakukan langsung pada kristal yang dibuat pelet dengan KBr, dari puncak-puncak spektrum yang dihasilkan akan dapat diketahui gugus-gugus molekul yang terdapat pada senyawa yang dianalisa.

3.2.6.3. Spektroskopi GC-MS

Pada pengujian dengan GC-MS, kristal dilarutkan dalam pelarut n-Heksana, kemudian dilakukan analisa dengan GC yang langsung berhubungan dengan MS sehingga dapat diketahui kemurnian senyawa serta berat molekul dan fragmentasinya dari spektrum MS.

