

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel

Sampel berupa kulit biji jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) diambil dari perkebunan jambu mete di daerah Wonogiri, Jawa tengah.

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Kloroform (p.a dan teknis)
2. n-heksana (p.a dan teknis)
3. Etil format (p.a dan teknis)
4. Metanol (p.a dan teknis)
5. Aseton (p.a dan teknis)
6. Aquadest
7. Ferri klorida 1%
8. Eter teknis
9. Asam klorida
10. Pereaksi Meyer
11. Asam sulfat (p)
12. Dimetil sulfoksida
13. Natrium Klorida

14. Asam sulfat
15. Asam asetat anhidrid
16. Silika gel 60 G
17. Silika gel GF₂₅₄
18. Ikan Guppy (*Poecilia reticulata* Peters)
19. Telur *Artemia salina* Leach

3.2.2. Alat

Alat-alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Perkolator
2. Erlenmeyer
3. Gelas ukur
4. Pengaduk
5. Spatula
6. Timbangan
7. Botol gelas
8. Blender
9. Oven listrik
10. Plat tetes,
11. Pipet
12. Corong gelas
13. Satu set *rotary evaporator*
14. Kapiler



15. Kromatografi Lapis Tipis
16. Lampu UV spectroline
17. Satu set kromatografi kolom vakum
18. Spektrofotometer IR Shimadzu FTIR 820 IPC
19. Spektrofotometer UV-Vis Milton Roy Spectronic 3000

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Persiapan sampel

Kulit biji jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dijemur sampai kering, kemudian ditumbuk dan diblender sehingga berupa serbuk.

3.3.2. Skrining fitokimia¹⁰⁾

- Fenol

Ekstrak kasar ditambah FeCl_3 1% terbentuk warna hijau sampai hitam, maka ekstrak mengandung senyawa fenol.

- Tanin

Ekstrak kasar ditambah HCl 0,1 N, kemudian dipanaskan timbul warna coklat kemerah-merahan, maka ekstrak mengandung senyawa tanin.

- Saponin

Ekstrak kasar ditambah air, dipanaskan 100°C , didinginkan 2-3 menit dan kemudian dikocok dan terjadi busa berbentuk khas (sarang lebah) dan stabil selama 0,5 jam, maka ekstrak mengandung saponin.

- Alkaloida

Sampel dihaluskan dalam lumpung porselen, ke dalamnya 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 Meyer. Apabila terbentuk endapan putih maka uji alkaloid positif.

- Steroida/triterpenoida

Ekstrak kasar ditambah dengan pereaksi Liebermann-Bouchard, memberikan warna hijau kebiru-biruan, maka ekstrak mengandung senyawa triterpenoida/steroida.

3.3.3. Ekstraksi sampel

Sampel sebanyak 1 kg diekstraksi dengan cara perkolasi menggunakan pelarut n-heksana. Ekstraksi dilakukan selama 3 x 12 jam. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh 351,5 g ekstrak kasar. Ekstrak kasar yang diperoleh kemudian diuji keaktifannya menggunakan ikan guppy dan *Artemia salina*. Selanjutnya dikromatografi lapis tipis untuk mengetahui jumlah komponen yang terkandung di dalamnya dan dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan kromatografi kolom vakum

3.3.4. Uji Aktivitas Ekstrak Kasar

- Terhadap ikan guppy
 - Ikan dipuasakan dahulu selama 1 malam
 - Disiapkan 7 bejana dan setiap bejana berisi 10 ekor ikan guppy dengan konsentrasi bervariasi dimulai dari 5, 10, 15, 20, 25 dan 40 ppm.
 - Uji aktivitas dilakukan dengan menghitung prosentasi kematian hewan yang diamati setelah 1 jam pemberian ekstrak n-heksana dengan pengulangan 3x.
 - Hasilnya terlihat dalam tabel (terlampir)

- Terhadap *Artemia salina* L.

Uji aktivitas dengan *Artemia salina* L. dilakukan dengan metode 'Brine Shrimp Lethality Test', yaitu melewati tahapan berikut :

a. Pembuatan air laut

3,8 gram NaCl dilarutkan dalam 100 mL aquadest kemudian disaring

b. Penetasan telur

Air laut yang sudah disiapkan ditempatkan dalam tanki penetas, kemudian telur *Artemia salina* dimasukkan dalam tanki selama 24 jam sampai telur-telur tersebut menetas. Larva kemudian diambil dan setelah dua hari larva tersebut dipakai untuk uji aktivitas

c. Pembuatan variasi konsentrasi sampel

Sampel disiapkan dengan cara mengambil ekstrak kasar sesuai kebutuhan dan dilarutkan dalam DMSO (dimetil sulfoksida) untuk membuat konsentrasi 10, 100 dan 1000 ppm.

d. Penentuan LC_{50}

Masing-masing larutan di atas ditempatkan dalam mikropate, kemudian diberi 30 ekor *Artemia salina* dan setelah 24 jam diamati jumlah *Artemia salina* yang hidup dan yang mati. Data yang diperoleh diolah dengan suatu program komputer (Bliss Methode) untuk menentukan LC_{50} . Hasil terlampir.

3.3.5. Pemisahan Pendahuluan

Sebelum pemisahan dengan kromatografi kolom, dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT). Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui jumlah komponen yang terkandung dalam sampel dan mencari eluen yang sesuai untuk pemisahan lebih lanjut. Sebagai fasa diam digunakan silika gel GF₂₅₄ dan fasa geraknya dipakai beberapa pelarut seperti : n-heksana, eter, petroleum eter, etil format, asam asetat dan variasi campuran pelarut-pelarut tersebut.

Sampel ditotolkan dengan pipa kapiler dalam lempeng kromatografi kemudian dielusi dengan fasa geraknya. Sebagai penampak bercak digunakan lampu UV. Dari hasil KLT diperoleh eluen yang paling baik adalah campuran kloroform : n-heksana : etil format (9 : 1 : 0,1).

3.3.6. Pemisahan dengan kromatografi kolom vakum

2,5 gram ekstrak kasar dikromatografi kolom vakum, dengan eluen campuran pelarut kloroform - n-heksana - etil format (9 : 1 : 0,1). Setiap kali elusi digunakan 50 mL eluen yang dimasukkan dari atas kolom dan dihisap dengan vakum kondensor. Eluat yang diperoleh ditampung dalam botol, selanjutnya

dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Eluat yang mempunyai harga Rf sama (A_1 dan A_2) digabung menjadi satu fraksi (fraksi I) dan A_3 dengan A_4 digabung menjadi satu fraksi (fraksi II). Terhadap fraksi I dilakukan penelitian lebih lanjut karena jumlahnya banyak.

3.3.7. Pemurnian

Fraksi I kemudian dikristalisasi dengan aseton, diperoleh padatan. Padatan tersebut dilarutkan dalam aseton panas, terdapat padatan yang larut dalam aseton panas dan yang tidak larut. Padatan yang larut dalam aseton panas selanjutnya diambil dan dilakukan rekristalisasi sehingga diperoleh senyawa murni.

3.3.8. Analisis senyawa hasil isolasi

3.3.8.1. Uji kromatografi lapis tipis

Senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam n-heksana kemudian ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis berfasa diam silika gel GF₂₅₄ dengan eluen n-heksana, kloroform, kloroform : n-heksana (1 : 1) dan kloroform : n-heksana (2 : 1). Senyawa murni ditunjukkan dengan adanya noda tunggal pada lempeng KLT. Sebagai penampak noda digunakan lampu UV.

3.3.8.2. Uji kelarutan

Senyawa yang diperoleh dilarutkan dalam berbagai pelarut yang diharapkan dapat mewakili tingkat-tingkat kepolaran seperti : n-heksana, kloroform dan metanol.

3.3.8.3. Analisis Spektra

- Analisis Spektra Infra Merah (IR)

Sebanyak ± 1 mg senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam kloroform, kemudian dimasukkan ke dalam alat infra merah. Dihasilkan grafik antara %T versus bilangan gelombang yang memberikan informasi adanya gugus fungsional dalam senyawa tersebut.

- Analisis Spektra Ultra Violet (UV)

Sejumlah cuplikan senyawa dilarutkan dalam kloroform kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan disinari dengan sinar UV. Spektra yang dihasilkan menunjukkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh sampel.

