

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat, Bahan dan Sampel

3.1.1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah:

- peralatan gelas umum untuk laboratorium kimia
- blender
- perkolator
- rotary evaporator Buchii
- hot plate
- spray-drier
- oven
- ruang pengembang KLT
- kolom kromatografi (panjang 60 cm, diameter 2,5 cm)
- preparator Desaga
- plat kaca (20x20 cm)
- peralatan untuk uji aktivitas
- lampu ultraviolet Spectroline (254 nm dan 365 nm)
- Spectrofotometer Ultraviolet Milton Roy Spectroline 3000 Array
- Spectrofotometer Infrared Shimadzu FTIR 8201 PC
- Gas Chromatography-Mass Spectrometry GCS HP 1800C.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah:

- pelarut-pelarut berkualitas p.a. (pro analysis) dan teknis seperti n-heksana, aseton, karbon tetraklorida, metilena klorida, kloroform, etil asetat, dietil eter, etanol, metanol, asam format dan aquadest
- pada pemisahan digunakan plat aluminium KLT Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck), Silica Gel 30-70 mesh (Merck) dan Silica Gel GF₂₅₄ 200-400 mesh (Merck)
- pada uji aktivitas digunakan air laut sintetik dan telur *Artemia salina* Leach.

3.1.3. Sampel

Kulit biji *Anacardium occidentale* L. digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini yang diperoleh dari daerah perkebunan di Purwantoro, Wonogiri.

3.2. Metode Kerja

Penelitian dilaksanakan melalui tiga bagian yang meliputi:

1. Isolasi dan pemurnian yang dilakukan di Laboratorium Kimia (khususnya Laboratorium Kimia Organik) Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang.
2. Uji aktivitas yang dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang.

3. Identifikasi senyawa terisolasi yang dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan BPPI Departemen Perindustrian Semarang.

3.2.1. Penyiapan Sampel

Kulit biji *Anacardium occidentale* L. diangin-anginkan selama semalam dan ditumbuk kasar. Tumbukan ini kemudian diblender sehingga diperoleh serbuk yang lebih halus.

3.2.2. Pembuatan Ekstrak

Serbuk kulit biji tersebut direndam dengan kloroform di dalam perkolator selama 2 hari. Ekstrak yang terbentuk kemudian dipisahkan dan disaring sampai didapat ekstrak yang jernih. Penguapan pelarut dari ekstrak dilakukan dengan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak pekat. Terhadap ekstrak pekat kemudian dilakukan uji aktivitas awal menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test*.

3.2.3. Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Terhadap ekstrak pekat dilakukan analisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui jumlah senyawa yang dapat terpisah dan mencari komposisi pengembang pada pemisahan terbaik untuk kemudian dilakukan kromatografi kolom dengan komposisi pengembang tersebut.

3.2.4. Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Sebanyak 3 gram ekstrak pekat dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang telah diisi dengan 80 gram silika gel. Sebagai fasa gerak digunakan sistem pengembang isokratik, yaitu campuran antara n-heksana, kloroform dan etil asetat dengan perbandingan volume 2:5:5. Fraksi-fraksi hasil kolom ditampung ke dalam botol kecil untuk tiap 10 mL. Tiap-tiap fraksi ini kemudian dianalisis dengan KLT untuk mengetahui jumlah senyawa yang terkandung dan pola-pola noda yang terbentuk pada KLT. Penggabungan fraksi dilakukan jika hasil KLT menunjukkan pola noda yang sama. Terhadap fraksi-fraksi tersebut juga dilakukan uji aktivitas untuk mengetahui masing-masing aktivitasnya.

3.2.5. Pemisahan dengan KLT Preparatif

Terhadap fraksi hasil kolom yang mengandung jumlah noda paling sedikit dan aktif pada uji aktivitas dilakukan pemisahan dengan KLT preparatif menggunakan pengembang n-heksana:kloroform:etil asetat dengan perbandingan volume 1:4:2.

Plat KLT preparatif dibuat dengan cara menyaputkan silika gel GF₂₅₄ yang dibuat bubuk dengan aquadest pada plat kaca dengan ukuran 20x20 cm menggunakan Preparator Desaga. Plat ini kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan diaktifkan dalam oven pada suhu 110 °C selama 1 jam.

Noda yang berada di tengah kemudian dikerok dan dilarutkan dengan kloroform kemudian disaring untuk memisahkan silika gel. Senyawa yang didapat kemudian dipisahkan dengan menguapkan pelarut.

3.2.6. Pemurnian

Kristalisasi senyawa dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol dan pengujian kemurnian dilakukan dengan KLT menggunakan berbagai pengembang tunggal seperti n-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol.

3.2.7. Identifikasi

Kristal yang diperoleh kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometri UV dan IR serta spektrometri massa. Data-data spektra ini kemudian diinterpretasi untuk mengetahui kemungkinan struktur senyawanya.

3.2.8. Uji Aktivitas

Uji aktivitas dilakukan terhadap ekstrak pekat, fraksi kolom dan kristal yang diperoleh.

1. Pembuatan Air Laut Sintetik

Sebanyak 38 gram garam kasar dilarutkan dalam 1 L aquadest dan disaring.

2. Penetasan Telur

Air laut sintetik ditempatkan dalam wadah penetas dan sebanyak satu ujung sendok kecil telur *Artemia salina* Leach. disebarkan dalam wadah dan dibiarkan 24-36 jam dibawah cahaya lampu sampai menetas. Setelah telur menetas, larva *Artemia salina* Leach. (nauplii) dibiarkan 24 jam sebelum digunakan.

3. Pembuatan Variasi Konsentrasi

Sebanyak 2 mg sampel dilarutkan dalam 2 mL kloroform sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan induk ini dibuat variasi konsentrasi 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm dan 0,1 ppm menggunakan mikropipet. Masing-masing konsentrasi ditempatkan dalam botol 10 mL dan untuk tiap konsentrasi dibuat rangkap tiga untuk pengulangan. Sebagai standar digunakan kloroform tanpa penambahan sampel. Pelarut dalam tiap botol kemudian diuapkan dalam hotplate.

4. Pengujian Terhadap Nauplii

Pada masing-masing botol pada tiap konsentrasi ditempatkan 10 ekor nauplii dan dibiarkan selama 24 jam dibawah cahaya lampu. Setelah 24 jam dihitung jumlah nauplii yang mati dan yang hidup.

5. Pengolahan Data

Data yang diperoleh untuk tiap konsentrasi diolah dengan program komputer untuk memperoleh harga LC_{50} .