

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan, Alat

3.1.1. Sampel

Sampel berupa daun mindi (*Melia azedarach* Linn) yang diambil dari daerah Boyolali, Jawa Tengah.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

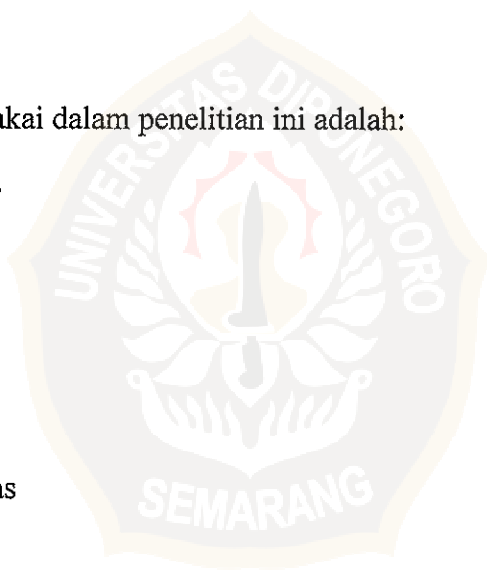
- *n*-heksana (teknis, p.a)
- kloroform (teknis, p.a)
- metanol (teknis, p.a)
- etil asetat (teknis, p.a)
- propanol (p.a)
- pereaksi Mayer
- pereaksi Leibermann-Burchard
- kristal iodium
- silika gel 60G
- plat Kromatografi Lapis Tipis GF254
- akuades
- besi (III) klorida
- natrium klorida
- amonium hidroksida

- asam sulfat
- kalium iodida
- natrium hidroksida
- asam klorida
- serbuk magnesium
- amilalkohol
- merkuri (II) klorida
- telur *Artemia salina*, Leach

3.1.3. Alat

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah:

- Gelas beker
- Pipet tetes
- Pipet ukur
- Pengaduk
- Corong gelas
- Spatula
- Evaporator putar
- Plat KLT
- Pipa kapiler
- Seperangkat alat kromatografi kolom
- Lampu UV merk spectroline ($\lambda = 254$ nm dan 365 nm)
- Fisher-John Melting Point



- Spektrofotometer UV tipe Milton Roy Spectronic 3000 array
- Spektrofotometer IR tipe Shimadzu FTIR 8201 PC
- GC-MS Shimadzu QP-5000

3.2. Metode Kerja

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UNDIP, Semarang sedangkan analisis terhadap isolat yang diperoleh dilakukan di Laboratorium Instrumentasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.2.1. Ekstraksi Sampel

Setengah kilogram sampel yang sudah dikeringkan, ditumbuk kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut *n*-heksana, metanol, dan etil asetat masing-masing selama 3 x 24 jam.

Filtrat yang didapat dipekatkan dengan evaporator putar sehingga diperoleh ekstrak kasar *n*-heksan 8 gram, ekstrak kasar metanol 5 gram dan ekstrak kasar etil asetat 5 gram.

Terhadap masing-masing ekstrak dilakukan uji golongan.

3.2.2. Uji Golongan

a) Alkaloid

Ekstrak kasar ditambahkan NH_4OH 25% 3 tetes dan ditambahkan kloroform. Filtrat disaring dan ditambah 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 Mayer yang dibuat dari 1,36 gram HgCl_2 dan ditambahkan 60 mL akuades serta 5 gram KI yang dilarutkan dalam 10 mL akuades, kemudian diencerkan sampai 100 mL. Apabila terbentuk endapan putih maka ekstrak positif alkaloid.

b) Steroid/ Triterpenoid

Ekstrak kasar ditambah dengan pereaksi Liebermann Buchard yang terdiri 5 tetes asam asetat anhidrid dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Warna hijau kebiruan menunjukkan ekstrak mengandung senyawa steroid dan warna merah menunjukkan ekstrak mengandung senyawa triterpenoid.

c) Kuinon

Ekstrak kasar ditambahkan air, dididihkan kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat hasil penyaringan ditambahkan NaOH 1 N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya kuinon dalam ekstrak tersebut.

d) Tanin

Ekstrak kasar dididihkan dalam 10 mL air, didinginkan kemudian disaring dan ditambah FeCl_3 . Timbulnya warna coklat kemerah-merahan, mengindikasikan ekstrak mengandung senyawa tanin.

e) Flavonoid

Ekstrak kasar ditambahkan pita Mg, HCl dan amilalkohol, kemudian dikocok, didiamkan sehingga terjadi pemisahan, terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid dalam ekstrak tersebut

Dari hasil uji tersebut, ekstrak kasar hasil uji golongan yang positif terhadap uji steroid akan dilakukan pemisahan lebih lanjut.

3.2.3. Pembuatan Kromatografi Kolom

Kolom kromatografi dibilas dengan menggunakan pelarut kloroform. Adsorben silika gel 60G diaktifkan dalam oven pada suhu 110 °C selama 2 x 24 jam. Setelah dingin, silika gel 60G dibuat menjadi bubuk menggunakan pelarut kloroform. Silika bubuk dimasukkan ke dalam kolom yang telah diisi pelarut kloroform. Adsorben dielus dengan pelarut sambil dipukul pelan-pelan pada sisi kolom sehingga adsorben padat.

3.2.4. Pemisahan Senyawa

Untuk mengetahui jumlah komponen yang ada dalam ekstrak etil asetat, maka dilakukan uji bercak dengan metode kromatografi lapis tipis. Sebagai fasa diam digunakan silika gel GF₂₅₄ dan untuk fasa geraknya dipakai beberapa pelarut seperti *n*-heksan, kloroform, etil asetat, dan metanol serta variasi dari campuran pelarut-pelarut tersebut.

Ekstrak ditotolkan dengan pipa kapiler pada lempeng kromatografi kemudian dielus dengan fasa geraknya. Sebagai penampak bercak digunakan

lampu UV. Dari hasil kromatografi lapis tipis diperoleh eluen yang dapat memisahkan komponen senyawa paling baik adalah campuran kloroform : *n*-heksan (9 : 1).

Selanjutnya senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak kasar tersebut dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 sebanyak 80 gram yang kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan panjang 30 cm dan diameter 5 cm yang bagian bawahnya telah disumbat. Ekstrak dengan berat 5 gram dilarutkan dalam campuran kloroform : *n*-heksan (9 : 1) secukupnya dan digerus dengan silika gel sampai semua silika gel terserap. Selanjutnya sampel tersebut dimasukkan ke dalam kolom. Fase gerak yang digunakan adalah campuran kloroform : *n*-heksan (9 : 1). Dari kromatografi kolom vakum ditampung 25 fraksi dengan setiap fraksinya sebanyak 50 mL.

Untuk mengetahui jumlah komponen yang ada pada setiap fraksi hasil kromatografi kolom vakum tersebut, dilakukan uji bercak kromatografi lapis tipis dengan perbandingan kloroform : *n*-heksan (1 : 1). Fraksi-fraksi yang mempunyai harga R_f sama digabungkan dan dilakukan uji steroid pada tiap fraksinya.

Fraksi yang positif terhadap uji steroid tersebut dilakukan penguapan pelarutnya pada suhu kamar hingga diperoleh padatan kemudian dilakukan KLT preparatif. Selanjutnya dilakukan uji kemurnian terhadap senyawa hasil isolasi dengan kromatografi lapis tipis menggunakan berbagai pelarut. Senyawa murni ditunjukkan dengan adanya noda tunggal pada lempeng KLT.

3.2.5. Analisis Senyawa Hasil Isolasi

3.2.5.1. Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Untuk menguji kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan analisis KLT dengan pelarut murni *n*-heksan, kloroform, etil asetat, metanol dan propanol. Jika noda yang terbentuk telah tunggal maka senyawa yang dihasilkan diharapkan telah murni.

3.2.5.2. Uji Steroid

Uji steroid dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa steroid pada hasil isolasi tersebut. Uji steroid ini dilakukan dengan menambahkan pereaksi Libermann-Burchard, positif steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan pada senyawa hasil isolasi tersebut.

3.2.5.3. Analisis Spektrum Ultraviolet

Sejumlah cuplikan isolat dilarutkan ke dalam pelarut kloroform, kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer UV tipe Milton Roy Spectronic 300 array.

3.2.5.4. Analisis Spektrum Infra Merah

Isolat yang diperoleh dilarutkan dalam pelarut kloroform kemudian larutan ini dianalisis dengan spektrofotometer inframerah seri Shimadzu FTIR-8201 PC, pada rentang bilangan gelombang $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$.

3.2.5.5. Analisis Spektrum Massa

Isolat yang diperoleh dilarutkan ke dalam pelarut kloroform kemudian larutan tersebut diinjeksikan ke dalam alat GC-MS tipe Shimadzu QP-5000.

3.2.6 Uji Aktivitas^[25]

Uji aktivitas dengan *Artemia salina* Leach dilakukan dengan metode “Brine Shrimp Lethality Test” yaitu melewati tahap berikut:

a) Pembuatan medium sintetik

3,8 gram NaCl dilarutkan dalam 100 mL aquades 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 menetas. Larva kemudian diambil dan setelah 2 hari larva tersebut dipakai untuk uji aktivitas.

c) Pembuatan variasi konsentrasi sampel

Sampel sebanyak 2 mg dilarutkan dalam 2 mL kloroform sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan induk ini dibuat variasi konsentrasi 100, 50 dan 10 ppm. Masing-masing konsentrasi dibuat rangkap 3 untuk pengulangan. Sebagai standar digunakan kloroform tanpa penambahan sampel. Pelarut dalam tiap botol kemudian diuapkan di atas pemanas (*hot plate*).

d) Penentuan LC_{50}

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

