

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Sampel

Sampel berupa tanaman purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk) yang diperoleh dari desa Sikunang, Dieng, Wonosobo, Jawa Tengah

3.2. Bahan

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi ialah yang berkualitas teknis seperti metanol, *n*-heksan dan diklorometan. Sebagai fasa diam dalam kromatografi kolom vakum digunakan silika gel; dan untuk kromatografi lapis tipis, sebagai pengembang digunakan pelarut dengan kualitas p.a. seperti *n*-heksan, kloroform, etil asetat dan metanol; sedangkan sebagai fasa diam digunakan Silika Gel Merck Kiesiegel 60 GF₂₅₄. Untuk penapisan fitokimia digunakan amoniak, asam sulfat pekat, pereaksi Meyer, serbuk Magnesium, amil alkohol, asam klorida pekat, Ferri klorida 1% dan asam asetat anhidrat. Untuk uji toksisitas digunakan aquadest, natrium klorida dan dimetil sulfoksida.

3.3. Alat

Peralatan yang mendukung penelitian ini yaitu pipa kapiler, lampu UV merk Spektroline dan *chamber* untuk kromatografi lapis tipis, vakum, satu set alat ekstraksi soklet, penguap putar merk Buchii, kolom kromatografi vakum, oven, neraca analitis, mikro pipet dan peralatan gelas yang biasa digunakan dalam

laboratorium. UV-Vis Milton Ray Spectonic 3000 dan IR Shimadzu FTIR-820 IPC digunakan untuk analisis senyawa hasil isolasi.

3.4. Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia F-MIPA Universitas Diponegoro, untuk analisis spektroskopi UV-Vis dan FTIR dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia F-MIPA Universitas Gadjah Mada.

3.4.1. Ekstraksi dan Fraksinasi Sampel

Tanaman Purwoceng diekstraksi dengan metode sokletasi menggunakan pelarut metanol. Terhadap ekstrak metanol tersebut dilakukan fraksinasi menggunakan kromatografi kolom vakum dengan pelarut *n*-heksan, kloroform, etil asetat dan etanol. Pada kromatografi kolom vakum dengan pelarut *n*-heksan diperoleh tiga fraksi, yaitu fraksi A, B dan C.

3.4.2. Skrining Fitokimia Fraksi A, B dan C

Terhadap ekstrak fraksi A, B dan C dilakukan uji golongan kimia meliputi alkaloid, flavonoid, senyawa fenolik, saponin dan triterpenoid/ steroid.

Uji Alkaloid

Sampel dihaluskan dalam lumpang dengan menambah 10 mL kloroform. Kemudian ditambahkan 10 mL kloroform-amoniak 0,005 N, diaduk/digerus lagi perlahan. Larutan disaring dan hasil saringan dimasukkan tabung reaksi. Lalu ditambahkan 10 tetes asam sulfat 2 N, dikocok perlahan dan dibiarkan sejenak

hingga terbentuk pemisahan lapisan asam dan kloroform. Selanjutnya diambil lapisan asamnya dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Larutan ini ditambahkan setetes pereaksi Meyer. Reaksi positif ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih/ endapan (Culvenor-Fitzgerald, 1963).

Uji Flavonoid

Sampel dimaserasi dengan etanol panas, kemudian diuapkan. Kemudian ditambahkan kloroform dan air suling (1 : 1) sebanyak 5 mL, dikocok dan dibiarkan sejenak hingga terbentuk dua lapisan kloroform-air. Lapisan kloroform di bagian bawah digunakan untuk pemeriksaan senyawa terpenoid dan steroid, sedangkan lapisan air untuk pemeriksaan kandungan flavonoid.

Sebagian dari lapisan air diambil dan dipindahkan dengan pipet ke dalam tabung reaksi kecil. Kemudian dimasukkan bubuk Magnesium dan beberapa tetes asam klorida pekat dan amil alkohol. Terbentuknya warna orange sampai merah menandakan adanya flavonoid (Nordin, 1985).

Uji Senyawa Fenolik

Sebagian dari lapisan air dimasukkan ke dalam plat tetes dan kemudian ditambahkan pereaksi FeCl_3 . Terbentuknya warna biru/ungu menandakan adanya kandungan senyawa fenolik.

Uji Triterpen/ Steroid

Lapisan kloroform diambil sedikit kemudian dimasukkan ke dalam plat tetes dan dibiarkan sampai kering. Ke dalam plat ditambahkan setetes asam asetat

anhidrat dan setetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna biru atau ungu menandakan adanya steroid, sedangkan bila terbentuk warna merah menandakan adanya kandungan terpenoid.

Uji Saponin

Sebanyak 5 gram serbuk dididihkan dalam 100 mL air selama 5 menit, kemudian saring dalam keadaan panas. 10 mL larutan tersebut dikocok kuat secara vertikal selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang pada penambahan setetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin.

3.4.3. Uji Toksisitas

Uji toksisitas yang digunakan adalah metode Brine Shrimp Lethality Test dengan menggunakan *Artemia salina*. Uji toksisitas ini dilakukan terhadap fraksi A, B dan C. Adapun tahapan uji yang dilakukan sebagai berikut: (Dharma,2001)

1. Pembuatan air laut sintesis

Sebanyak 3,8 gram NaCl dilarutkan dalam 1000 mL aquadest.

2. Penetasan telur

Air laut ditempatkan di dalam tangki yang terdiri dari dua bagian, pada bagian pertama diletakkan telur udang dan pada bagian lainnya diletakkan lampu untuk menarik udang melalui lubang-lubang dari pembatas. Larva udang siap digunakan untuk uji setelah berumur dua hari.

3. Uji Toksisitas Fraksi A, B dan C *n*-Heksan

Sebanyak 5 mg sampel dilarutkan dengan 50 μ L DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) dalam 5 mL larutan air laut sintesis sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan 1000 ppm dibuat konsentrasi 100, 10 dan 1 ppm. Masing-masing konsentrasi dibuat pengulangan sebanyak tiga kali. Ke dalam masing-masing botol yang sudah berisi larutan sampel dimasukkan 10 larva udang. Untuk kontrol dilakukan langkah yang sama namun tanpa penambahan sampel. Setelah 24 jam dihitung jumlah larva yang masih hidup. Berdasarkan jumlah larva yang hidup, dapat ditentukan harga LC₅₀ dari senyawa uji.

3.4.4. Pemisahan Senyawa-senyawa

Analisis selanjutnya dilakukan terhadap fraksi B karena fraksi A telah dikerjakan oleh Nurhasnawati (2002). Terhadap fraksi B ini dilakukan analisis KLT menggunakan pelarut-pelarut organik seperti *n*-heksan, kloroform, etil asetat dan metanol. Eluen terbaik hasil KLT ini menjadi dasar pemisahan senyawa-senyawa selanjutnya. Pemisahan dilanjutkan dengan KLT Preparatif menggunakan eluen terbaik hasil KLT. Bila senyawa murni belum diperoleh, pemisahan senyawa senyawa dilakukan kembali dengan KLT preparatif.

3.4.5. Analisis Isolat Murni

Analisis untuk mengetahui kemurnian senyawa yang diperoleh dilakukan dengan KLT berbagai pelarut. Selanjutnya dilakukan uji golongan kimia, uji kelarutan dan analisis dengan spektroskopi UV-Vis dan FTIR.