

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Prosedur kerja yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi 3 tahap, yaitu pemisahan, identifikasi, dan uji aktivitas. Pemisahan komponen dilakukan dengan ekstraksi cara maserasi, kromatografi kolom vakum, dan TLC preparatif; identifikasi komponen dilakukan dengan spektroskopi UV-Vis; dan uji aktivitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*.

3.1 Sampel, Alat dan Bahan

3.1.1 Sampel

Sampel berupa rimpang bengle yang diperoleh dari daerah Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah, Indonesia.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah etil asetat, kloroform, *n*-heksana, aquades sebagai pelarut dengan kualitas teknis, amonia 25 %, pereaksi Mayer, serbuk Magnesium, asam klorida pekat, amilalkohol, larutan besi (III) klorida, natrium hidroksida 1 N, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat sebagai reagen skrining fitokimia, silika gel G⁶⁰ sebagai fasa diam kromatografi kolom vakum, plat TLC E Merck GF²⁵⁴, sebagai fasa diam kromatografi lapis tipis, metanol (p.a), etil asetat (p.a), kloroform (p.a), *n*-heksana (p.a) sebagai fasa gerak kromatografi lapis tipis, iod, larutan besi (III) klorida sebagai penampak noda, dimetil sulfoksida (DMSO),

garam dapur kasar untuk uji aktivitas, natrium hidroksida anhidrat (p.a), aluminium klorida, asam klorida, natrium asetat anhidrat (p.a), dan asam borat (p.a) untuk membuat pereaksi geser.

3.1.3 Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan laboratorium yang umum, satu set alat maserasi, evaporator putar Buchii, kromatografi kolom vakum dan kromatografi preparatif untuk memisahkan senyawa, plat TLC untuk pemeriksaan noda, lampu UV spektrolin, spektrofotometer UV-Vis tipe U-2010 untuk mengidentifikasi senyawa hasil isolasi.

3.2 Metode Kerja

Penelitian ini dilakukan di laboratorium kimia organik jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, analisis spektroskopi UV-Vis dilakukan di laboratorium BPPIP Jawa Tengah.

3.2.1 Preparasi sampel

Rimpang bengle segar sebanyak 3,5 kg dibersihkan, diiris halus, dan dikeringkan pada temperatur kamar dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering rimpang tersebut dihaluskan sehingga didapatkan serbuk bengle kering sebanyak 900 g. Rimpang bengle yang sudah dibuat serbuk diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etil asetat selama 3 x 24 jam. Hasilnya kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator, sehingga dihasilkan ekstrak kasar.

3.2.2 Pembuatan pereaksi

1. Pereaksi Liebermann-Burchad

Pereaksi Liebermann-Burchad terdiri dari anhidrida asam asetat dan asam sulfat pekat yang disimpan terpisah.

2. Pereaksi Mayer

Lima gram kalium iodida dilarutkan dalam 90 mL aquades kemudian larutan merkuri (II) klorida ditambahkan secara perlahan-lahan sambil diaduk. Larutan diencerkan dengan aquades sampai volume 100 mL.

3. Larutan Besi (III) Klorida 1 %

Satu gram besi (III) klorida ditempatkan dalam labu takar 100 mL kemudian sedikit asam klorida ditambahkan dan dicampur secara merata. Larutan diencerkan dengan aquades sampai volumenya 100 mL.

4. Pereaksi Geser

a. Larutan Natrium Hidroksida 2 N

Delapan gram natrium hidroksida anhidrat (p.a) ditempatkan dalam labu takar 100 mL. Kemudian aquades ditambahkan sampai volume 100 mL.

b. Larutan Alumunium Klorida

Lima gram Alumunium klorida ditempatkan dalam labu takar 100 mL. Metanol (p.a) ditambahkan sampai volume 100 mL.

c. Asam Klorida (HCl)

Asam klorida pekat sebanyak 5 mL ditambahkan ke dalam 10 mL aquades.

3.2.3 Uji golongan (penapisan fitokimia)

Uji golongan dilakukan terhadap ekstrak etil asetat untuk mengetahui kandungan kimianya.

1. Uji Alkaloid

Sampel dilembabkan dengan amonia 25 % dan digerus menggunakan krus porselen. kloroform ditambahkan, kemudian digerus kuat dan disaring. Sampel kemudian diekstraksi 2 kali dengan asam klorida 10 %. Larutan kemudian ditambah dengan pereaksi Mayer. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih setelah ditambah pereaksi Mayer.

2. Uji Saponin

Sampel dididihkan dalam air kemudian disaring dalam keadaan panas. Larutan dikocok kuat ke arah vertikal selama 10 detik. Adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil.

3. Uji Flavonoid

Sampel ditambah dengan serbuk magnesium kemudian ditetesi dengan asam klorida pekat. Adanya flavonoid ditandai dengan perubahan warna dari orange sampai merah.

4. Uji Tanin

Sampel ditambah dengan larutan besi (III) klorida 1 %. Adanya tanin ditandai dengan terbentuknya warna hijau violet.

5. Uji Kuinon

Sampel ditambah dengan beberapa tetes larutan natrium hidroksida 1 N. Adanya kuinon ditandai dengan terbentuknya warna merah.

6. Uji Steroid dan Triterpenoid

Sampel dimasukkan dalam cawan porselen dan ditambah 10 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah ungu, sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.

3.2.4 Pemisahan komponen

Uji golongan dilakukan terhadap ekstrak etil asetat. TLC dilakukan dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, kloroform, metanol, dan campuran pelarut-pelarut tersebut dengan berbagai perbandingan tertentu. Campuran pelarut *n*-heksan dan etil asetat (1 : 1) memberikan pola pemisahan terbaik. Ekstrak etil asetat kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum menggunakan campuran pelarut *n*-heksan dan etil asetat (1 : 1). Kromatografi kolom vakum yang digunakan dalam penelitian ini dapat diamati pada Gambar 3.1 (Lampiran C). Hasil kromatografi kolom vakum dianalisis dengan TLC menggunakan campuran pelarut *n*-heksan dan kloroform (1 : 9). Pengamatan noda dilakukan dengan lampu UV dan penampak noda iod. Fraksi yang mempunyai pola noda sama digabung menjadi satu fraksi, kemudian diuji golongannya dan dianalisis dengan TLC. Terhadap fraksi A kemudian dilakukan analisis TLC dengan pelarut metanol dan penampak noda FeCl₃. Pemisahan komponen dilakukan dengan TLC preparatif menggunakan pelarut metanol. Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan uji golongan. Kemurnian senyawa dianalisis dengan TLC dua dimensi.

3.2.5 Analisis struktur flavonoid

Analisis struktur flavonoid dilakukan dengan spektroskopi UV-Vis (alat dapat diamati pada Gambar 3.2; Lampiran D) menggunakan pereaksi geser. Spektrum flavonoid ditentukan dalam pelarut metanol (p.a). Larutan flavonoid dibuat dengan melarutkan flavonoid dalam pelarut metanol (p.a). Tahapan kerja menggunakan pereaksi geser adalah sebagai berikut:

1. Spektrum flavonoid dalam pelarut metanol ditentukan terlebih dahulu. Tiga tetes larutan natrium hidroksida 2 N ditambahkan dalam sampel, kemudian ditentukan spektrumnya. Setelah lima menit spektrumnya ditentukan kembali.
2. Enam tetes pereaksi alumunium klorida ditambahkan dalam larutan flavonoid, dicampurkan secara merata kemudian diukur spektrumnya. Selanjutnya, tiga tetes asam klorida ditambahkan, dicampur dan spektrumnya diukur kembali.
3. Serbuk natrium asetat ditambahkan dalam larutan flavonoid sampai membentuk lapisan setebal 2 mm. Campuran dikocok kemudian diukur spektrumnya. Selanjutnya asam borat ditambahkan setebal 1 mm (setengah dari natrium asetat) dan spektrumnya diukur kembali.

3.2.6 Uji aktivitas

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

1. Pembuatan Medium Penetasan

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

2. Penetasan Telur

Medium penetasan ditempatkan dalam wadah penetas dan sebanyak satu ujung sendok kecil telur *Artemia salina* Leach. disebar dalam wadah dan dibiarkan selama 24-36 jam di bawah cahaya lampu sampai menetas. Setelah telur menetas, larva *Artemia salina* Leach. (nauplii) dibiarkan 24 jam sebelum digunakan.

3. Pembuatan Variasi Konsentrasi

Sampel sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 50 μ L DMSO per 5 mL medium penetasan sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi sebesar 1000 ppm. Kemudian dengan larutan induk tersebut dibuat variasi konsentrasi 100 ppm, 10 ppm, dan 1 ppm menggunakan mikropipet. Masing-masing konsentrasi ditempatkan dalam botol 10 mL dan untuk setiap konsentrasi dibuat rangkap tiga untuk pengulangan. Sebagai blanko digunakan 50 μ L DMSO per 5 mL medium penetasan tanpa penambahan sampel.

4. Pengujian terhadap Nauplii

Masing-masing botol pada tiap konsentrasi ditempatkan 10 ekor nauplii dan dibiarkan 24 jam di bawah cahaya lampu. Setelah 24 jam dihitung jumlah nauplii yang hidup dan yang mati.

5. Pengolahan Data

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