

BAB III

METODE PENELITIAN

Sampel berupa serbuk bengle dimaserasi dengan pelarut etil asetat kemudian dipekatkan. Ekstrak pekat diuji golongan kemudian dilakukan KLT dan difraksinasi dengan kromatografi kolom vakum. Selanjutnya isolat dipisahkan dengan KLT preparatif. Hasilnya dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis, IR, dan GC-MS serta diuji aktivitasnya dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*.

3.1. Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1. Sampel

Sampel yang digunakan adalah rimpang bengle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang diperoleh dari daerah Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan sebagai pelarut adalah *n*-heksana teknis, etil asetat teknis, *n*-heksana p.a, kloroform p.a, , etil asetat p.a, dan metanol p.a. Silika gel G₆₀ sebagai fasa diam kromatografi kolom vakum dan plat KLT Merck GF₂₅₄ untuk menganalisis komponen dalam sampel dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Sedangkan penapisan fitokimia menggunakan: pereaksi Meyer, ferri klorida 1 %, pereaksi Liebermann-Burchard dan natrium hidroksida 1 N.

3.1.3. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan laboratorium berupa seperangkat alat gelas, satu set alat maserasi, penguap putar merk Buchii, kromatografi kolom vakum untuk pemisahan senyawa, lampu ultraviolet (UV) merk Spektroline, spektrofotometer ultraviolet-tampak (UV-Vis) merk Milton Roy Spectronic 3000 Array, spektrometer inframerah (IR) merk Shimadzu, dan kromatografi gas-spektrometer massa (GC-MS) merk Shimadzu untuk menentukan struktur molekul senyawa hasil isolasi.

3.2. Metode Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis spektroskopi UV-Vis, IR dan GC-MS dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.2.1. Preparasi Sampel

Rimpang bengle segar sebanyak 3,5 kg dibersihkan, diiris tipis kemudian dikeringkan. Setelah kering, rimpang dihaluskan sehingga didapat serbuk bengle kering sebanyak 900 gram. Serbuk bengle kering diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etil asetat selama 3 x 24 jam. Hasilnya dipekatkan dengan penguap putar hingga didapat ekstrak etil asetat pekat.

3.2.2. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap fraksi etil asetat rimpang bengle yaitu menguji keberadaan senyawa-senyawa golongan alkaloid, flavonoid, tanin, steroid/terpenoid, dan kuinon.

a. Uji Alkaloid

Sebanyak kira-kira 4 mg sampel dimasukkan tabung reaksi kemudian ditambah beberapa tetes pereaksi Meyer. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih.

b. Uji Flavonoid

Sampel sebanyak 2 mg ditambah dengan 2 tetes HCl 2 N, serbuk Mg dan 0,5 mL amil alkohol kemudian dikocok dengan baik. Timbulnya warna kuning sampai merah pada lapisan amil alkohol menandakan adanya flavonoid.

c. Uji Tanin

Sampel sebanyak 2 mg ditambah dengan beberapa tetes larutan FeCl_3 1 %. Adanya tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau violet.

d. Uji Terpenoid/Steroid

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

e. Uji Kuinon

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

3.2.3. Pemisahan Senyawa dan Pemurnian

Ekstrak etil asetat difraksinasi menggunakan kromatografi kolom vakum (KKV) dengan pelarut campuran *n*-heksana : etil asetat (1 : 1). Masing-masing fraksi hasil kromatografi kolom vakum ditampung kemudian diuji dengan KLT dibantu dengan lampu UV pada panjang gelombang 365 nm sebagai penampak noda. Fraksi dengan jumlah noda dan harga R_f yang sama digabungkan menjadi satu botol. Masing-masing fraksi dideteksi jumlah dan warna nodanya dengan reagen penampak noda H_2SO_4 10 %. Noda yang menghasilkan warna merah setelah penyemprotan dimurnikan dengan KLT preparatif.

3.2.4. Analisis Senyawa Hasil Isolasi

Isolat dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis, IR, dan GC-MS. Hasil analisis ini digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat dalam isolat.

3.2.5. Uji Aktivitas

Uji aktivitas biologis yang digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* dengan menggunakan hewan uji *Artemia salina*. Adapun tahapan uji aktivitas ini adalah sebagai berikut :

a. Pembuatan air laut sintetis

Sebanyak 3,8 g garam kasar dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian disaring.

b. Penetasan telur *Artemia salina*

Air laut sintetis yang sudah disiapkan ditempatkan dalam wadah penetas dan sebanyak ujung sendok kecil telur *Artemia salina* disebarkan dalam wadah penetas dan dibiarkan selama 24 jam sampai telur-telur tersebut menetas.

c. Pembuatan variasi konsentrasi

Sebanyak 5 mg isolat dilarutkan dalam 50 μ L DMSO dan 5 mL air laut sintetis sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut dibuat variasi konsentrasi 100 ppm, 10 ppm dan 1 ppm. Masing-masing konsentrasi ditempatkan dalam botol 10 mL dan dibuat rangkap tiga untuk pengulangan. Sebagai standar digunakan larutan DMSO dalam air laut sintetis tanpa sampel.

d. Pengujian terhadap hewan uji *Artemia salina*

Pada masing-masing botol dari tiap konsentrasi ditempatkan 10 ekor *Artemia salina* dan dibiarkan selama 24 jam di bawah cahaya lampu. Setelah 24 jam dihitung jumlah *Artemia salina* yang mati.

e. Pengolahan data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer yaitu metode analisis probit untuk memperoleh harga LC_{50} .