

## BAB III

### METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etil asetat, fraksinasi sampel dengan kromatografi kolom vakum dengan eluen *n*-heksana–etil asetat (1 : 1). Pemisahan dan identifikasi senyawa dilakukan dengan TLC preparatif dan spektroskopi UV-Vis dan FTIR. Uji aktivitas senyawa dilakukan 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 berderajat teknis adalah etil asetat, *n*-heksana, kloroform dan aquades. Silika gel G 60 sebagai fasa diam kromatografi kolom vakum, dan plat TLC E Merck GF<sup>254</sup> untuk menganalisis komponen dalam sampel dengan metode kromatografi lapis tipis. Pengembang dalam kromatografi lapis tipis digunakan pelarut p.a. seperti metanol, etil asetat, *n*-heksana dan kloroform. Pereaksi yang digunakan untuk penapisan fitokimia adalah pereaksi Meyer, ferri klorida 1 %, anhidrat asam asetat, asam sulfat pekat, natrium hidroksida 1 N, logam Mg dan asam klorida.

### 3.1.3. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan laboratorium yang umum yaitu satu set alat maserasi, evaporator putar merk Buchii, kromatografi kolom vakum dan TLC preparatif untuk pemisahan senyawa, lampu UV merk spectroline. Analisis struktur senyawa hasil isolasi menggunakan spektrofotometer UV tipe Milton Roy Spectronic 3000 array dan spektrofotometer IR tipe Shimadzu FTIR 8201 PC.

## 3.2. Prosedur penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang, analisis spektroskopi UV dan IR 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 dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, rimpang dihaluskan sehingga didapat serbuk sebanyak 900 gram. Serbuk tersebut diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etil asetat selama 3 x 24 jam. Hasilnya dipekatkan dengan rotary evaporator hingga didapat ekstrak etil asetat.

### 3.2.2. Pembuatan pereaksi penapisan fitokimia

Pereaksi yang dibuat untuk identifikasi golongan senyawa adalah sebagai berikut :

#### a. Pereaksi Liebermann-Burchad

Pereaksi ini terdiri dari anhidrida asam asetat dengan asam sulfat pekat yang dikemas terpisah.

#### b. Pereaksi Mayer

Merkuri klorida sebanyak 1,36 g ditambahkan 60 mL akuades serta larutan 5 g KI dalam 10 mL aquades. Campuran keduanya diencerkan menjadi 100 mL dengan aquades. Disimpan dalam botol gelap.

#### c. Larutan 1 % FeCl<sub>3</sub>

Sebanyak 1g FeCl<sub>3</sub> ditempatkan dalam labu takar 100 mL yang berisi 2 mL HCl 2 M dan diencerkan dengan aquades sampai dengan tanda batas.

### 3.2.3. Penapisan fitokimia

Terhadap ekstrak etil asetat dilakukan penapisan fitokimia terhadap golongan alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid, kuinon dan saponin.

#### Uji alkaloid

Sampel dimasukkan tabung reaksi kemudian ditambah pereaksi Mayer. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih.

#### Uji flavonoid

Sampel direbus dengan air dan disaring. Filtrat ditambahkan pita Mg, HCl dan amil alkohol kemudian dikocok, didiamkan hingga terjadi pemisahan. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol.

### Uji tanin

Sampel ditambah dengan larutan 1 %  $\text{FeCl}_3$ . Adanya tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau violet.

### Uji triterpenoid/steroid

Sampel dimasukkan dalam cawan porselin dan ditambah pereaksi Liebermann-Burchad. Adanya triterpenoid ditandai dengan perubahan warna merah ungu sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.

### Uji kuinon

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

### Uji saponin

Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah air dan dididihkan. Setelah sampel dingin kemudian dikocok kuat-kuat. Adanya saponin ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil selama 30 menit.

### **3.2.4. Pembuatan kromatografi kolom vakum**

Kolom kromatografi beserta tabung vakumnya dicuci dan dibilas dengan pelarut yang akan digunakan. Alat dipasang dan dihubungkan dengan vakum kondensor. Fasa diam (silika gel G 60) diaktifkan dalam oven pada suhu  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Setelah dingin, silika gel G 60 dimasukkan ke dalam kolom kemudian vakum kondensor dihidupkan hingga fasa diam memadat. Fasa diam dielusi dengan pelarut yang akan digunakan.

### 3.2.5. Isolasi senyawa dan pemurnian

Ekstrak etil asetat diuji dengan kromatografi lapis tipis untuk menentukan jumlah komponen dalam ekstrak tersebut serta untuk menentukan pelarut terbaik yang akan digunakan dalam kromatografi kolom vakum. Eluen yang digunakan dalam kromatografi lapis tipis (TLC) adalah *n*-heksana, kloroform, etil asetat, metanol, dan campuran eluen-eluen tersebut dengan perbandingan tertentu. TLC dengan campuran eluen *n*-heksana–etil asetat (1 : 1) memberikan pola pemisahan terbaik. Selanjutnya, sebanyak lima gram ekstrak etil asetat dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum dengan pelarut *n*-heksana–etil asetat (1 : 1). Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom ini ditampung kemudian dilakukan TLC menggunakan berbagai eluen seperti metanol, etil asetat, kloroform dan *n*-heksana serta campuran eluen-eluen tersebut dengan dibantu lampu UV untuk penampakan noda. Pemisahan terbaik ditunjukkan oleh campuran eluen *n*-heksana–kloroform (1 : 9). Fraksi-fraksi dengan jumlah noda dan harga  $R_f$  yang sama disatukan dan diperoleh 5 fraksi utama, yaitu fraksi A, B, C, D, dan E. Terhadap kelima fraksi tersebut dilakukan uji golongan. Dari kelima fraksi tersebut, fraksi A mempunyai noda berwarna ungu yang tampak dengan pereaksi semprot  $H_2SO_4$  10 % dalam metanol.

Pemurnian kandungan senyawa fraksi A dilakukan dengan metode TLC preparatif menggunakan plat TLC E Merck GF<sup>254</sup> dan eluen *n*-heksana–kloroform (1 : 9). Pita yang diambil adalah pita dengan harga  $R_f$  sebesar 0,90 dan berwarna ungu.

### **3.2.6. Identifikasi senyawa hasil isolasi**

#### **3.2.6.1. Kromatografi lapis tipis**

Pengujian kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan analisis TLC baik satu dimensi maupun dua dimensi dengan pelarut metanol, etil asetat, kloroform, *n*-heksana, dan gabungan dari dua pelarut tersebut. Penampakan noda yang digunakan adalah lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm. Apabila noda yang terbentuk tunggal, diharapkan senyawa yang dihasilkan telah murni.

#### **3.2.6.2. Spektroskopi UV**

Pada pengujian dengan spektrofotometer UV, kristal dilarutkan dalam pelarut kloroform kemudian diukur panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi maksimum sehingga diketahui transisi elektron yang terjadi.

#### **3.2.6.3. Spektroskopi Infra Merah**

Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan analisis IR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi dan jenis-jenis ikatan dalam senyawa tersebut.

### **3.2.7. Uji aktivitas**

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

a. Pembuatan air laut sintetis

Sebanyak 3,8 gram garam dapur kasar dilarutkan dalam 100 mL aquades kemudian disaring.

b. Penetasan telur

Air laut sintetis yang sudah disiapkan ditempatkan dalam wadah penetas kemudian sebanyak ujung sendok kecil telur *Artemia salina* dimasukkan dalam wadah dan dibiarkan selama 24 jam sampai telur-telur tersebut menetas. Larva kemudian diambil dan setelah dua hari larva tersebut dipakai untuk uji aktivitas.

c. Pembuatan variasi konsentrasi

Sebanyak 5 mg sampel dilarutkan dalam 50  $\mu$ L DMSO (dimetil sulfoksida) per 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 blanko digunakan larutan DMSO dan air laut sintetis tanpa sampel.

d. Pengujian terhadap Nauplii

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

e. Pengolahan data

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