

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Sampel

Sampel berupa tanaman purwoceng (*Pimpinella alpina* molk) diperoleh dari desa singkunang, Dieng, Wonosobo.

#### 3.2. Alat

Peralatan yang mendukung penelitian ini adalah pipa kapiler, lampu UV<sub>254</sub>, chamber untuk kromatografi lapis tipis, satu set alat sokletasi, penguap putar merk Buchi, kolom kromatografi vakum, neraca analitis dan peralatan gelas yang biasa dipakai dalam penelitian dilaboratorium. Analisis senyawa hasil isolasi dipakai spektroskopi GC-MS.

#### 3.3. Bahan

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah pelarut yang bersifat teknis seperti metanol, n-heksan, dan diklorometana. Silika gel digunakan untuk kromatografi kolom vakum; pelarut dengan kualitas p.a seperti *n*-heksan, kloroform, dan metanol sebagai pengembang dalam Kromatografi Lapis Tipis; sedangkan sebagai fasa diam digunakan silika gel Merck Kiesel 60 GF 254.

### **3.4. Prosedur Kerja**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, untuk analisis GC-MS dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Gadjah Mada.

#### **3.4.1. Ekstraksi dan Fraksinasi**

Tanaman purwoceng dipotong-potong kemudian disokletasi dengan metanol kualitas teknis. Terhadap ekstrak metanol dilakukan fraksinasi dengan menggunakan Kromatografi Kolom Vakum dengan pelarut *n*-heksan. Dari fraksinasi ini diperoleh fraksi A, B dan C.

#### **3.4.2. Pemisahan dan Pemurnian**

Terhadap fraksi C ini dilakukan analisis KLT menggunakan pelarut organik seperti *n*-heksan, metanol, dan kloroform. Eluen terbaik hasil KLT ini menjadi dasar pemisahan selanjutnya. Pemisahan dilanjutkan dengan kromatografi kolom gravitasi dan pemurnian dengan menggunakan kromatografi lapis tipis.

#### **3.4.3. Analisis Senyawa**

Identifikasi senyawa hasil pemisahan dilakukan dengan menggunakan instrumen GC-MS.

#### 3.4.4. Uji Toksisitas Ekstrak *n*-heksan, fraksi A, B, dan C

Uji toksisitas yang digunakan berupa uji toksisitas. Metode yang dipakai adalah *Brine Shrimp lethality Test* (BST) dengan menggunakan *Artemia salina*. Uji toksisitas ini dilakukan terhadap ekstrak *n*-heksan, fraksi A, B, dan C. Adapun tahapan uji yang dilakukan sebagai berikut: (McLaughlin, 1991)

1. Pembuatan air laut sintesis

Sebanyak 38 gram NaCl dilarutkan dalam 1 L aquades.

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 Ekstrak heksan

Sampel sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 1mL DMSO sampai 100 mL larutan air laut sintesis sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan 1000 ppm dibuat konsentrasi 100 dan 10 ppm. Masing-masing konsentrasi dibuat pengulangan sebanyak 3 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  $LC_{50}$  dari senyawa uji.