

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan, dan Alat

3.1.1. Sampel

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

3.1.2. Bahan

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi berkualitas teknis seperti metanol. Etil asetat, n-butanol, n-heksan dan metilen klorida. Sedangkan pelarut yang berkualitas p.a. seperti n-heksan, kloroform dan metanol, digunakan sebagai pengembang dalam kromatografi lapis tipis. Untuk fasa diam dalam kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis dipakai silika gel 60 dan Plat KLT silika gel merk Kiesiegel 60 F₂₅₄. Untuk penapisan fitokimia digunakan amoniak, asam sulfat pekat, pereaksi meyer, serbuk magnesium, amil alkohol, asam klorida pekat, feri klorida 1 % dan asam asetat anhidrid.

3.1.3. Alat

Peralatan yang mendukung penelitian ini adalah pipa kapiler, lampu UV, chamber untuk kromatografi lapis tipis, satu set alat maserasi, penguap putar merk buchi, corong pisah, neraca analitis, dan peralatan gelas yang biasa dipakai dalam

penelitian di laboratorium. Analisis senyawa hasil isolasi menggunakan GC-MS Shimadzu QP-5000.

3.2. Metode kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia F-MIPA Universitas Diponegoro dan analisis dengan GC-MS dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia F-MIPA Universitas Gadjah Mada.

3.2.1. Maserasi

Akar purwoceng diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Kemudian terhadap ekstrak metanol ini dilakukan fraksinasi dengan pelarut n-heksan, dilanjutkan dengan metilen klorida, etil asetat dan n-butanol sehingga diperoleh fraksi metilen klorida, etil asetat dan n-butanol. Fraksi metilen klorida dianalisis dengan KLT menggunakan pelarut-pelarut organik seperti n-heksan, metilen klorida, kloroform, etil asetat, metanol dan campuran dua pelarut dengan perbandingan tertentu. Eluen terbaik hasil KLT ini yang menjadi dasar pemisahan senyawa-senyawa dengan kromatografi kolom.

3.2.2. Skrining Fitokimia Fraksi Metilen Klorida

Terhadap ekstrak fraksi metilen klorida dilakukan uji golongan kimia meliputi alkaloid, flavonoid, senyawa fenolik, dan terpenoid/steroid.

3.2.2.1. Uji Alkaloid

Sampel dihaluskan dalam lumpang dengan menambahkan sejumput pasir dan 10 mL kloroform. Kemudian ditambahkan kloroform-amonia 0.05 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 sehingga 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).

3.2.2.2. Uji Flavonoid

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

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

3.2.2.3. Uji Senyawa fenolik

Sebagian dari lapisan air dimasukkan ke dalam plat tetes dan kemudian ditambahkan pereaksi FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru/ungu menandakan adanya kandungan senyawa fenolik (Nordin, 1985)

3.2.2.4. Uji Terpenoid/Steroid

Diambil sedikit lapisan kloroform, dimasukkan ke dalam lubang plat tetes dan dibiarkan sampai kering. Kemudian ditambahkan setetes asam asetat anhidrat dan setetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna biru ungu menandakan adanya steroid, sedangkan bila terbentuk warna merah menunjukkan adanya kandungan terpenoid (Nordin, 1985).

3.2.3. Uji Toksisitas

Uji toksisitas yang digunakan adalah metode *Brine Shrimp lethality Test* (BST) dengan menggunakan *Artemia Salina*. Uji toksisitas ini dilakukan terhadap fraksi metilen klorida, etil asetat, n-butanol dan n-heksan. Adapun tahapan uji yang dilakukan sebagai berikut:

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. Pembuatan variasi konsentrasi

Sebanyak 1000 mg sampel ditambah 50 μ L DMSO (*Dimetil Sulfoksida*) dilarutkan dalam air hingga mencapai 100 mL sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 10.000 ppm. Dari larutan 10.000 ppm dibuat

konsentrasi 1000, 100 dan 10 ppm dengan mengambil secara tepat 1000, 100 dan 10 μ L larutan induk. Masing-masing konsentrasi dibuat pengulangan sebanyak lima kali.

4. Uji aktivitas fraksi metilen klorida, etil asetat dan n-butanol

Ke dalam masing-masing botol yang sudah berisi larutan sampel dimasukkan 10 larva udang dan air laut buatan sehingga mencapai volume 10 mL. Untuk kontrol dilakukan langkah yang sama namun tanpa penambahan sampel. Setelah 24 jam dihitung jumlah larva yang masih hidup.

5. Data yang diperoleh untuk tiap konsentrasi diolah dengan metode *finney* untuk menentukan harga LC_{50} masing-masing fraksi (Meyer, 1982).

3.2.4. Pemisahan Senyawa-Senyawa

Terhadap ekstrak metilen klorida dilakukan kromatografi kolom grafitasi dengan eluen terbaik hasil KLT. Eluat ditampung tiap 10 mL dan dianalisis kembali dengan KLT. Eluat dengan pola noda yang sama disatukan. Bila senyawa murni belum diperoleh, pemisahan senyawa-senyawa fraksi metilen klorida dilakukan dengan KLT preparatif.

3.2.5. Analisis Isolat Murni

Analisis untuk mengetahui senyawa yang diperoleh dilakukan dengan KLT beberapa pelarut murni. Selanjutnya dilakukan uji golongan kimia dan analisis dengan GC-MS.

Kondisi operasi GC-MS:

3.2.5.1. Injektor

Temp. : 350 °C

3.2.5.2. Oven

Temperatur awal : 100 °C

Waktu awal : 5 menit

Temperatur program	: laju (°C/min)	temp (°C)	waktu (min)
	10	350	50

3.2.5.3. Pengontrol aliran gas

Tekanan gas pembawa : 10 kPa

Total alir : 30 ml/min

3.2.5.4. Kolom

Panjang : 25 m

Diameter : 0.25 mm

3.2.5.5. Permukaan

Temperatur : 300 °C

