

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi asam tanat dan membandingkan toksisitas asam tanat dalam ekstrak daun Ketapang dengan asam tanat standar. Daun Ketapang diperoleh dari daerah Tembalang, Semarang. Daun Ketapang diekstraksi secara bertahap dengan pelarut *n*-heksan dan aseton-air dengan perbandingan 7:3. Hasil ekstrak kemudian diuji kandungan fitokimianya. Ekstrak yang mengandung tanin dianalisa dengan KLT dan HPLC untuk mengidentifikasi adanya asam tanat. Toksisitas asam tanat dalam ekstrak dengan asam tanat standar dibandingkan melalui harga LC_{50} dengan metode BSLT.

3.1 Peralatan dan Bahan – bahan

3.1.1 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.) yang berasal dari daerah Tembalang, Semarang.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan meliputi : akuades, metanol, aseton, *n*-heksan, ammonia, kloroform, asam klorida, natrium hidroksida, feri klorida, asam asetat, etil asetat, asam fosfat, pereaksi Meyer, pereaksi Liebermann-Burchard, asam tanat, telur *Artemia salina*, garam laut.

3.1.2 Alat

Satu set alat sokhlet, hot plate, neraca analitis, *chamber*, plat silika, akuarium, lampu, peralatan gelas, botol vial, HPLC Shimadzu LC-10AD.

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Perlakuan Awal Sampel

Daun Ketapang segar yang sudah tua (berwarna kuning) dicuci sampai bersih kemudian diangin-anginkan hingga kering. Setelah kering diblender hingga halus.

3.2.2. Pembuatan Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia catappa L.*)

Seratus gram sampel disokletasi dengan pelarut *n*-heksan sampai pelarut jernih. Ampas yang diperoleh dikeringkan. Setelah kering disokletasi dengan pelarut campuran aseton-air dengan perbandingan volume 7:3 sampai pelarut jernih. Kemudian ekstrak yang diperoleh, diuapkan sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh diuji kandungan fitokimianya.

3.2.3. Skrining Fitokimia

1. Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak ditambahkan 10 ml kloroform-ammonia 0,05N, kemudian disaring. Ekstraksi larutan dengan asam sulfat 2N, ambil lapisan asam dan pindahkan pada tabung reaksi kecil. Tambahkan setetes pereaksi Meyer. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih (Culvenor, 1963).

2. Pemeriksaan Saponin

Ekstrak dikocok kuat selama 10 detik. Kemudian diamati timbulnya busa. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil (Nordin, 1985).

3. Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak ditambah serbuk Mg dan beberapa tetes asam klorida pekat. Terbentuknya warna orange sampai merah menandakan adanya flavonoid (Nordin, 1985).

4. Pemeriksaan Senyawa Fenolik & Tanin

Ekstrak diletakkan dalam plat tetes kemudian ditambah FeCl_3 . Jika terjadi perubahan warna menjadi hijau violet, hitam menunjukkan keberadaan tanin (Nordin, 1985).

5. Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Ekstrak dimasukkan dalam cawan ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika terbentuk warna biru, menunjukkan adanya steroid. Sedangkan bila terbentuk warna merah, menunjukkan adanya terpenoid (Nordin, 1985).

3.2.4. Identifikasi Asam Tanat dengan KLT

Ekstrak kental dan asam tanat (sebagai standar) masing-masing dilarutkan dalam pelarut aseton-air (7:3). Kemudian dianalisa dengan Kromatografi Lapis Tipis menggunakan pengembang asam asetat-etil asetat (1:5). Noda diamati dengan penampak noda larutan FeCl_3 5% dan dibandingkan harga Rf-nya dengan asam tanat standar (Pansera, 2004).

3.2.5. Identifikasi Asam Tanat dengan *Reverse Phase*-HPLC

3.2.5.1. Preparasi Cuplikan

1. Preparasi larutan standar asam tanat

0,5 mg asam tanat dilarutkan dalam 1 ml metanol-air (7:3).

2. Preparasi larutan ekstrak aseton-air daun Ketapang

5 mg ekstrak dilarutkan dengan pelarut metanol-air (7:3) dalam labu takar 10 ml

3. Preparasi larutan *spike* (campuran)

5 mg standar asam tanat dan 5 mg ekstrak dilarutkan dengan pelarut metanol-air (7:3) dalam labu takar 10 ml

3.2.5.2. Kondisi Operasi

Fasa gerak : Pelarut A : air-metanol-asam fosfat (975,5:19,5:5)

Pelarut B : metanol-air (700:300)

Kecepatan alir : 1, 2 ml/menit

Detektor : UV (280 nm)

Tekanan : 85 cmHg

Panjang kolom : 10 cm

Jenis kolom : Chrompack LiChrospher RP-C18 (5 μ m) 100 x 3,0 mm

Volume Injeksi : 20 μ l

Elusi gradient :

Waktu (menit)	A	B
0	100	0
15	100	0
22	0	100
25	0	100
30	100	0
33	100	0

(Makkar, 2000)

3.2.6. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

3.2.6.1. Penetasan *Artemia salina*

Air laut buatan untuk penetasan telur dibuat dengan melarutkan 38 gram garam laut ke dalam 1000 ml aquades. Air laut (hasil buatan) ditempatkan dalam sebuah akuarium yang terdiri dari dua bagian, pada bagian yang gelap (tertutup) dimasukkan telur *Artemia salina* secukupnya. Pada bagian lainnya diletakkan lampu untuk menarik udang melalui lubang pembatas. Larva udang siap digunakan untuk uji setelah berumur dua hari (Mc Laughlin, 1991).

3.2.6.2. Pembuatan Konsentrasi Sampel Uji

Sebanyak 1 gram sampel dan 1 gram standar asam tanat masing-masing dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 100 ml sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 10.000 ppm. Dari larutan 10.000 ppm dibuat konsentrasi 1000, 100, 10 ppm dengan mengambil secara tepat 1000 μ l, 100 μ l dan 10 μ l larutan induk dan diletakkan dalam botol vial yang berukuran 10 ml. Masing-masing konsentrasi dibuat pengulangan sebanyak lima kali (Meyer, 1982).

3.2.6.3. Uji Aktivitas

Pada masing-masing botol vial yang sudah berisi larutan sampel dimasukkan 10 ekor 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 (Meyer, 1982).

3.2.6.4. Penentuan Harga LC_{50}

Untuk menentukan nilai LC_{50} digunakan program *Finney Computer*, melalui hubungan konsentrasi dengan jumlah kematian hewan uji (Meyer, 1982).