

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Objek dan Lokasi Penelitian**

Objek atau bahan penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*) asal NTB. Untuk memastikan identitas dari tanaman salam yang didapatkan dari NTB maka dilakukan uji determinasi di Sekolah Tinggi Ilmu Hayati ITB Bandung. Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset, Laboratorium Kimia Organik Jurusan Pendidikan Kimia UPI Bandung, di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Pusat Penelitian Kimia.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat**

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, penguap berputar vakum (vacuum rotary evaporator), set alat kromatografi KVC, K. Flash, Spektroskopi NMR (*resonansi magnet inti*), serta spektrometri IR (*Infra Red*).

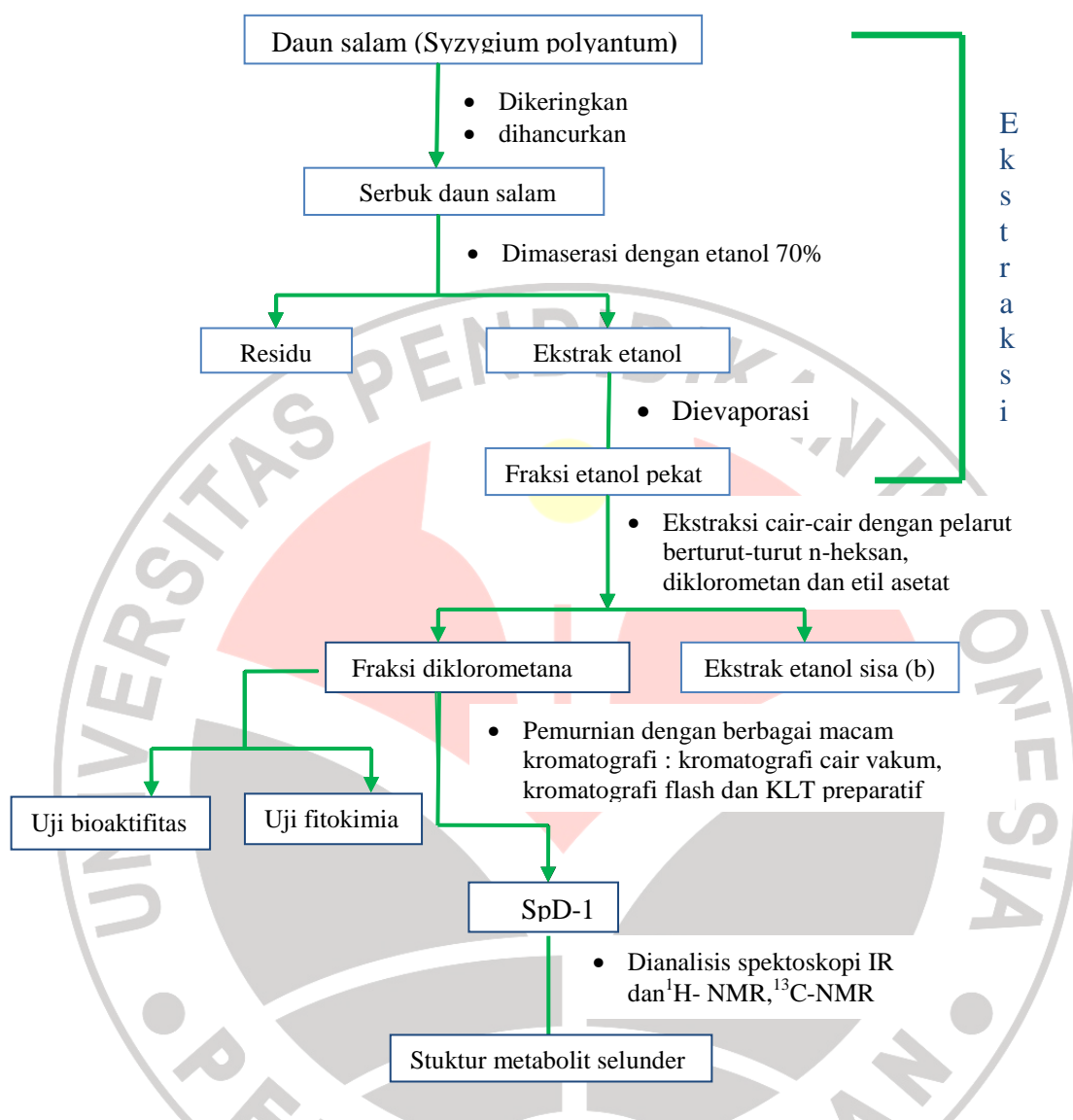
##### **3.2.2 Bahan**

Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*) asal NTB. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan teknis dan bahan pro analisis (p.a). Bahan dengan kualitas teknis didestilasi terlebih dahulu sebelum

digunakan. Bahan-bahan yang digunakan adalah etanol, metanol, heksan, etil asetat, aseton, diklorometana, kloroform p.a,  $\text{FeCl}_2$  5%,  $\text{HgCl}_2$ , HCl pekat, serbuk Mg p.a,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, KLT, aquades, kertas saring.

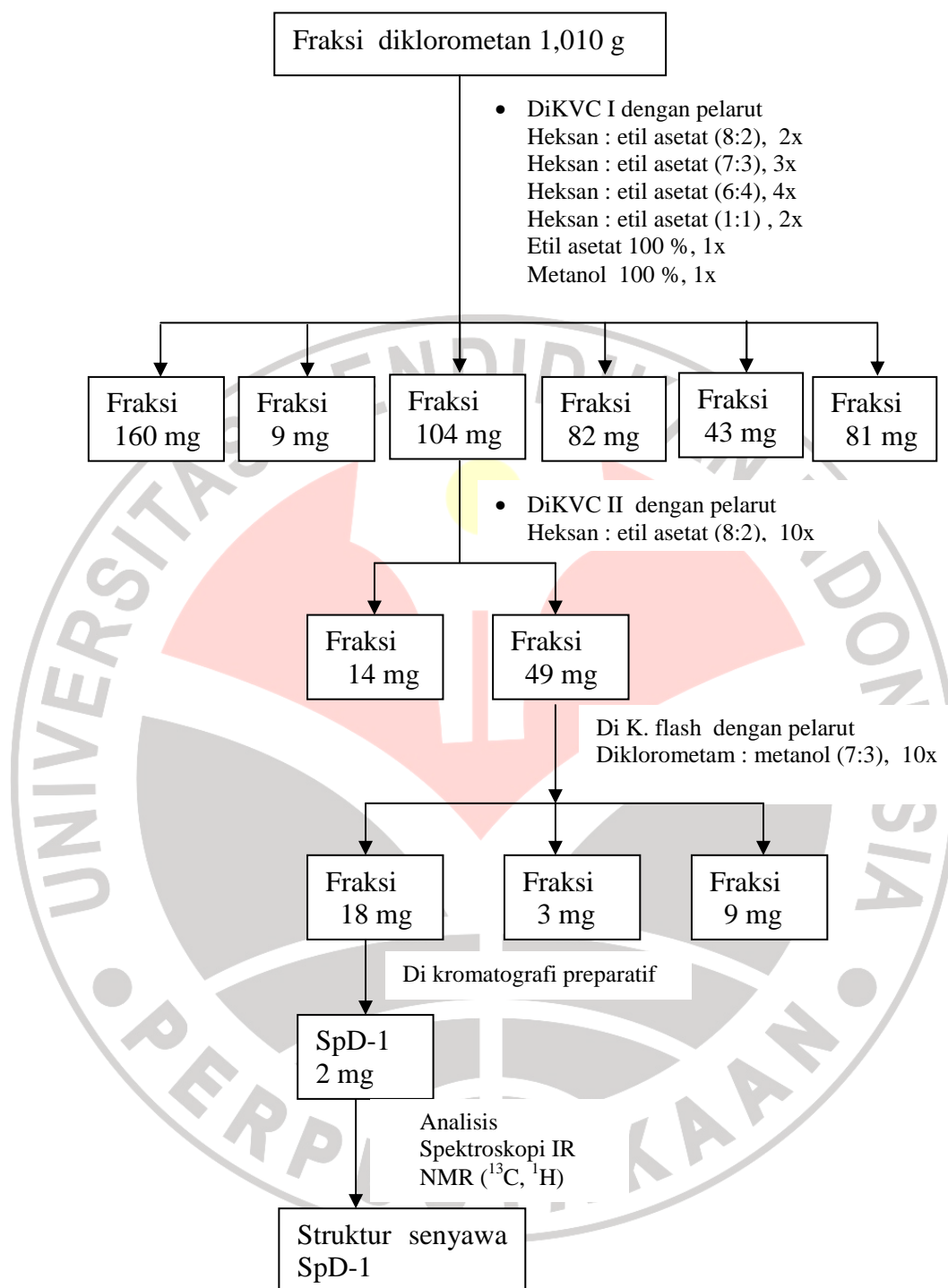
### 3.3 Metodologi Penelitian

Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*) asal NTB. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan teknis dan bahan pro analisis (p.a). Bahan dengan kualitas teknis didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan-bahan yang digunakan adalah etanol, metanol, heksan, etil asetat, aseton, diklorometana, kloroform p.a,  $\text{FeCl}_2$  5%,  $\text{HgCl}_2$ , HCl pekat, serbuk Mg p.a,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, KLT, aquades, kertas saring. Untuk metode penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.1



**Gambar 3.1** Bagan Alir Penelitian

Pada penelitian ini fraksi diklorometan dilanjutkan ketahap pemurnian, yaitu untuk mendapatkan senyawa murni dari fraksi diklorometan daun salam. Adapun uraian tahap pemurnian fraksi diklorometan ditunjukkan pada gambar 3.2.



**Gambar 3.2** Tahapan pemurnian senyawa

Uraian secara menyeluruh dari masing-masing pekerjaan yang dilakukan adalah sebagai berikut:

### 3.3.1 Penyiapan Sampel Tumbuhan

Tahap awal penelitian dimulai dari pengambilan adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*) asal NTB. Daun salam yang digunakan terlebih dahulu dikeringkan dengan bantuan sinar matahari sampai kering. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling sampai terbentuk serbuk. Kemudian serbuk daun salam yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui berat daun salam dalam kondisi yang telah dikeringkan.

### 3.3.2 Proses Ekstraksi

Serbuk daun salam (*Syzygium polyanthum*) diekstraksi menggunakan pelarut etanol. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut etanol 10 liter sebanyak 3 kali maserasi selama 24 jam. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan corong buchner Lalu filtratnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dalam keadaan vakum. Ekstrak pekat etanol kemudian ditimbang dan diencerkan kembali menggunakan 500 ml air.

### 3.3.3 Proses Fraksinasi

Ekstrak etanol yang telah diencerkan difraksinasi berturut-turut dengan heksan (3 x 200 ml), diklorometan (3 x 200 ml), etil asetat (3 x 200 ml) sehingga diperoleh fraksi diklorometan, dan dan etanol sisa.

fraksi yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara penguapan menggunakan alat *rotary evaporator* sampai diperoleh massa yang tetap dari fraksi.

### 3.3.4 Uji Fitokimia

Tiap fraksi diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode pereaksi warna yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalam masing-masing fraksi. Uji fitokimia dilakukan terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, dan tanin. Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

#### 3.3.4.1 Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes Pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid. Pembuatan Pereaksi Mayer yaitu satu gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades sampai semuanya melarut. Lalu ke dalam larutan KI tersebut dimasukkan 0,271 gram  $\text{HgCl}_2$  sampai larut.

#### 3.3.4.2 Pemeriksaan Saponin

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes aquades kocok selama 10 menit. Timbulnya buih/busa menunjukkan adanya senyawa saponin.

### 3.3.4.3 Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

### 3.3.4.4 Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

### 3.3.4.5 Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan 190 mL HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

### 3.3.5 Pengujian Efek Antidiabetes Fraksi Diklorometan Daun Salam

Mencit diabetes aloksan dipuasakan selama 16 jam, kemudian diambil darah mencit sebagai kadar glukosa awal. Mencit dibagi menjadi 6 kelompok mencit. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Kepada masing-masing kelompok mencit diberi perlakuan sebagai berikut : kelompok I diberi suspensi tragakan 2% sebagai

kelompok kontrol positif, kelompok II diberi air suling sebagai kelompok kontrol negatif, kelompok III diberi fraksi diklorometan daun salam dosis 50 mg/kg bb, kelompok IV diberi fraksi diklorometan daun salam dosis 100 mg/kg bb, kelompok V diberi fraksi diklorometan daun salam dosis 200 mg/kg bb, dan kelompok VI diberi pembanding glibenklamid dosis 5 mg/kg bb.

Sediaan uji diberikan secara peroral sebanyak 0,5 mL/20 g bb satu kali sehari terhadap semua kelompok perlakuan selama 14 hari. Pengambilan cuplikan darah dilakukan dengan cara memotong sedikit bagian ekor mencit. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebelum pemberian zat uji dan pada jam ke 1 setelah pemberian sediaan uji pada hari ke-1, 7, dan 14.

### **3.3.6 Analisis Spektroskopi**

#### **3.3.6.1 Pengujian Dengan Spektrometri FT-IR (Fourier Transform-Infra Red)**

Pemeriksaan IR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam ekstrak diklorometana dari daun salam (*Syzygium polyanthum*). Penentuan gugus-gugus fungsi dilakukan dengan menggunakan Spektrometri FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*) Shimadzu 8400.



### 3.3.6.2 Spektroskopi NMR (Resonansi Magnet Inti)

Pemeriksaan dengan Spektroskopi NMR dapat digunakan sebagai alat sidik jari dan juga memberikan keterangan tentang jumlah setiap tipe hidrogen. Ia juga memberikan keterangan tentang sifat lingkungan dari setiap atom hidrogen tersebut.

