

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian dimulai dari bulan Februari sampai Juni 2014. Lokasi penelitian dilakukan di berbagai tempat, antara lain:

- a. Determinasi sampel dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia
- b. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Riset FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia
- c. Proses pemisahan dan pemurnian, pengujian aktivitas antioksidan dan IR dilakukan di Laboratorium Instrumen FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia
- d. Pengujian aktivitas antimalaria dilakukan di Universitas Airlangga
- e. Pengujian spektroskopi NMR dilakukan di Institut Teknologi Bandung

3.2 Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini ditunjang oleh beberapa peralatan, antara lain peralatan gelas, perangkat alat destilasi, *vacuum rotatory evaporator*, *freeze dryer*, perangkat alat Kromatografi Kolom Gravitasi, perangkat alat Kromatografi Cair Vakum, spektrofotometer UV-Visible, spektrometer FTIR SHIMADZU 8400, dan spektrometer NMR AGILENT 500 MHz (^1H NMR) dan 125 MHz (^{13}C NMR).

Sampel yang digunakan berupa akar tumbuhan nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) bagian kayu yang diperoleh dari daerah Garut, Jawa Barat yang dikumpulkan pada bulan November 2013. Sedangkan bahan kimia yang digunakan antara lain berbagai pelarut organik meliputi metanol, n-heksana, etil asetat, diklorometana dan aseton yang diperoleh dalam grade teknis, yang terlebih

dahulu didestilasi dan pro analis (p.a). Selain itu, digunakan pula berbagai jenis silika gel, antara lain silika gel Merck 60 (70-230 mesh) *for chromatography*

Ai Rohimah, 2014

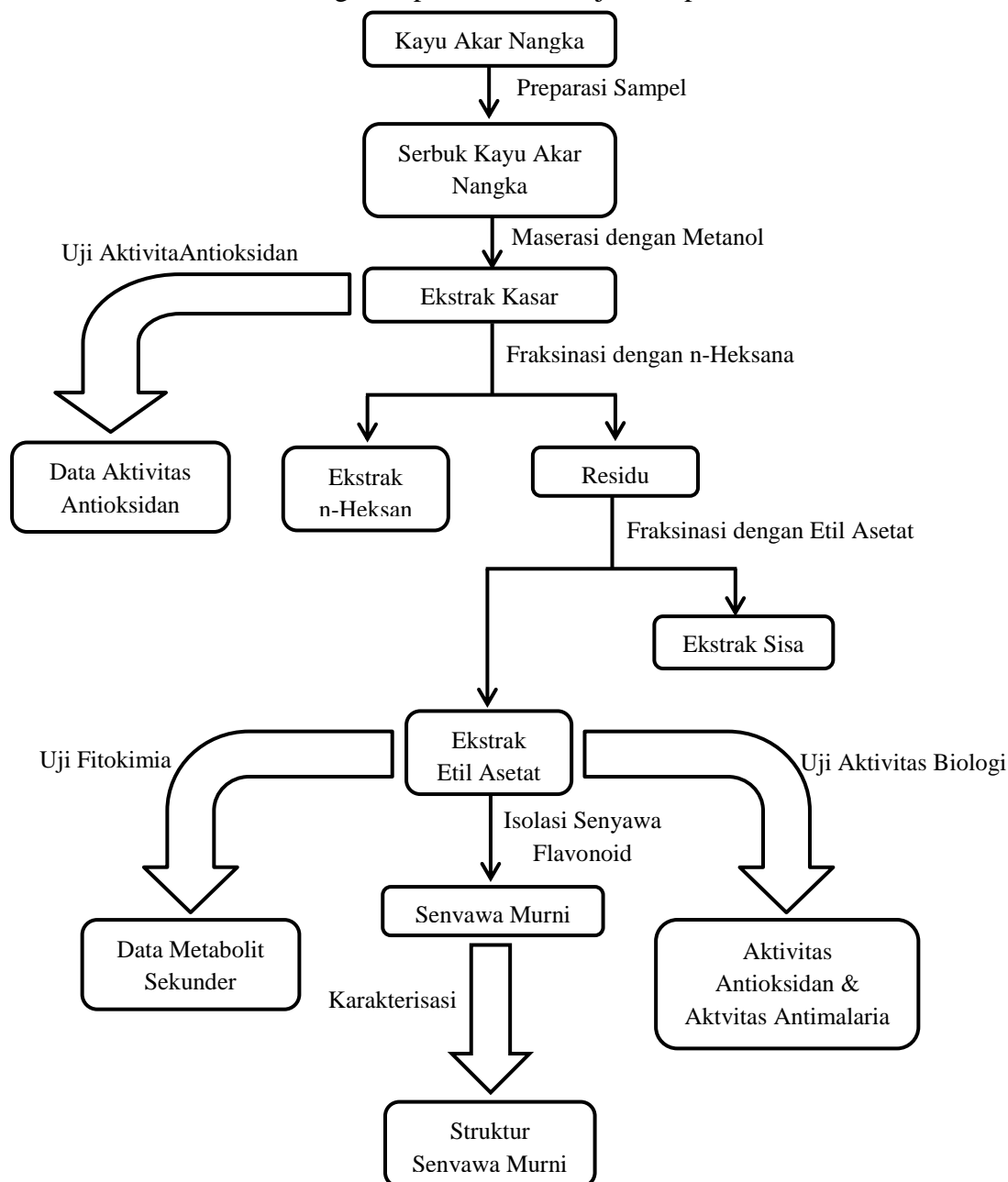
Aktivitas biologi dan isolasi senyawa flavonoid Dari ekstrak etil asetat kayu akar nangka (artocarpus heterophyllus lamk).

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

column, silika gel Merck 60 (35-70 mesh) dan plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ dengan ketebalan 0,25 mm.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi beberapa tahap penelitian, antara lain: penyiapan sampel, ekstraksi, fraksinasi, uji fitokimia, uji aktivitas biologi dan karakterisasi. Alur kegiatan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Ai Rohimah, 2014

Aktivitas biologi dan isolasi senyawa flavonoid Dari ekstrak etil asetat kayu akar nangka (artocarpus heterophyllus lamk).

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.3.1 Pengumpulan Sampel

Sampel akar nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) diperoleh dari daerah Garut, Jawa Barat. Akar nangka yang telah diperoleh kemudian dipisahkan antara bagian kayu dan kulitnya dan ditimbang untuk mengetahui massa awal sampel. Kemudian bagian kayu akar tersebut dikeringkan dan diserbuk lalu ditimbang kembali untuk mengetahui massa sampel dalam keadaan kering.

3.3.2 Ekstraksi

Serbuk kayu akar nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) diekstraksi menggunakan pelarut metanol. Teknik ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut metanol selama 1x24 jam dan dilakukan berulang sebanyak 3 kali yang dilakukan penggantian pelarut setiap harinya. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan corong Buchner lalu dipekatkan menggunakan *vacuum rotatory evaporator*. Ekstrak metanol yang diperoleh dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama (100 mL) dikeringkan dan dicatat sebagai ekstrak kasar, sedangkan bagian lainnya dilakukan fraksinasi cair-cair menggunakan n-heksana dan etil asetat sehingga diperoleh ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak sisa. Masing-masing ekstrak dikeringkan untuk mengetahui perolehan massanya.

3.3.3 Uji Skrining Fitokimia

Ekstrak etil asetat diidentifikasi kelompok metabolit sekundernya dengan pengujian secara kualitatif. Uji skrining fitokimia dilakukan terhadap golongan senyawa tanin, saponin, terpenoid, alkaloid dan flavonoid. Adapun prosedur kerja dalam pengujian ini adalah sebagai berikut:

a. Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara, 1 mL ekstrak ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 5%. Timbulnya warna hijau kebiruan mengindikasikan adanya tanin.

b. Pemeriksaan Saponin

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara, 2 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquades. Kemudian tabung reaksi tersebut dikocok selama ± 10 menit. Terbentuknya buih mengindikasikan adanya saponin.

c. Pemeriksaan Terpenoid

Pemeriksaan terpenoid dilakukan dengan cara, 1 mL ekstrak ditambahkan 1 mL CH_3COOH glasial dan 1 mL H_2SO_4 pekat. Timbulnya warna merah sampai coklat menunjukkan adanya terpenoid.

d. Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara, 1 mL ekstrak ditambahkan 2 mL kloroform dan beberapa tetes H_2SO_4 pekat hingga terbentuk dua lapisan. Kemudian ditambahkan pereaksi Wagner hingga terbentuk endapan coklat yang mengindikasikan adanya alkaloid.

e. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara, 1 mL ekstrak ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

3.3.4 Uji Aktivitas Biologi

Uji aktivitas biologi dilakukan terhadap ekstrak etil asetat dan metanol untuk aktivitas antioksidan dan ekstrak etil asetat untuk aktivitas antimalaria. Pengujian tersebut dilakukan untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan dan antimalaria dari ekstrak tersebut. Adapun prosedur pengujiannya adalah sebagai berikut:

a. Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan membuat larutan DPPH 0,5 mM dengan cara, menimbang 4,9 mg DPPH dan melarutkannya dengan metanol dalam labu ukur 25 mL. Selain itu, dibuat pula larutan sampel, larutan blanko dan larutan kontrol. Larutan sampel terdiri dari 0,5 mL sampel, 3 mL metanol dan 0,3 mL DPPH 0,5 mM. Larutan blanko

terdiri dari 0,5 mL sampel dan 3,3 mL metanol. Sedangkan larutan kontrol terdiri dari 3,5 mL metanol dan 0,3 mL DPPH 0,5 mM. Ketiga larutan tersebut diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer

UV-Visibel pada panjang gelombang 517 nm.

b. Uji Aktivitas Antimalaria

Pengujian aktivitas antimalaria mengikuti metode yang dilakukan oleh Budimulja (1997). Tiap komponen dilarutkan dalam DMSO (10^{-2} mol L⁻¹). Parasit penyebab penyakit malaria (*Plasmodium falciparum* Strain 3D7) dipropagasi dalam 24 sumur plat-kultur yang mengandung ekstrak etil asetat kayu akar nangka dalam berbagai konsentrasi. Pertumbuhan parasit dimonitor dengan *Blood smear* dalam MeOH dengan noda Geimsa sebagai penanda parasit.

3.3.5 Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Murni

Dalam tahap isolasi senyawa murni digunakan beberapa teknik kromatografi, antara lain Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Cair Vakum (KCV) dan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG). Ekstrak yang digunakan dalam proses isolasi senyawa flavonoid adalah ekstrak etil asetat.

Senyawa murni yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya dikarakterisasi menggunakan beberapa teknik spektroskopi, antara lain spektroskopi UV-Visibel, spektroskopi infra merah (IR) dan spektroskopi resonansi magnet inti (¹H dan ¹³C NMR). Teknik-teknik spektroskopi tersebut digunakan untuk mengidentifikasi struktur senyawa yang telah diisolasi.