

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang akan di gunakan selama penelitian adalah Ekstrak Remek Daging (*H. colorata*), pelarut n-heksana, etil asetat, metanol, asam sulfat, pelarut mayer, asam klorida pekat, aquadest, FeCl₃, asam asetat glasial, alumunium foil, silica gel, pereagen sitoborat, pereagen dragendroff, pereagen *liberman buchard*.

3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan bahan, neraca analitik (ae-ADAM), labu Erlenmeyer, tabung reaksi, oven, maserator, corong, kolom kromatografi, botol vial 10 ml, plat KLT (TLC Silicagel 60 F 254 *merck* 1.05554.0001), lampu UV (λ 254 dan 366 nm) sebagai pengungkap noda, batang pengaduk, spatula, botol coklat, pipet tetes, pipet ukur, pipet volum, micro pipet, jarum ose, *Rotary Evaporator* (EYELA OSB-2100-CE), *waterbath, chamber* dan alat-alat gelas ukur, beaker glass dan lainnya.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan Agustus 2020.

3.4 Persiapan Sampel

Tanaman remek daging dideterminasi terlebih untuk mendapatkan jenis tumbuhan yang digunakan. Sampel daun remek daging yang masih segar di rajang dan dikeringanginkan selama 3-5 hari yang bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terkandung didalamnya. Sampel yang telah dikeringkan, kemudian di haluskan menggunakan blander, yang bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sehingga interaksi antara sampel dengan pelarut semakain besar guna mempercepat proses pelarutan senyawa yang di inginkan. Sampel yang telah dihaluskan disimpan di dalam wadah tertutup baik untuk studi lebih lanjut.

3.5 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Pembuatan ekstrak Daun Remek Daging (*H. colorata*) akan dilakukan dengan cara maserasi, sebelum di maserasi remek daging dirajang dan dikering anginkan dan dihaluskan menggunakan blender terlebih dahulu selanjutnya di ekstraksi menggunakan pelarut yang sudah di tentukan yaitu menggunakan n-heksan, etil asetat dan metanol dengan cara di maserasi secara bertingkat (Markham, 1988).

Pelarut n-heksana dituang secara perlahan kedalam maserator. Selanjutnya, dibiarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia yang sesekali dilakukan pengadukan, penyaringan dan pekatkan dengan rotary evaporator, kemudian dilakukan remaserasi selama 4 sampai 6 hari hingga hasil atau filtrat dari hasil penyaringan hingga terjadi perubahan warna yang signifikan, kemudian dipekatkan dibawah titik didih sampai di peroleh ekstrak kental, kemudian keringkan untuk melanjutkan maserasi dengan pelarut berikutnya.

Pelarut etil asetat dituang secara perlahan kedalam maserator. Setelahnya, diberikan cairan penyari merendam serbuk simplisia yang sesekali dilakukan pengadukan, lalu dilakukan remaserasi selama 4 sampai 6 hari hingga hasil atau filtrat dari hasil penyaringan hingga terjadi perubahan warna yang signifikan, selanjutnya disaring kedalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan menggunakan evaporator dibawah titik didih sampai diperoleh ekstrak kental.

Pelarut metanol dituangkan secara perlahan kedalam maserator, selanjutnya dibiarkan cairan merendam serbuk simplisia yang sesekali dilakukan pengadukan, kemudian dilakukan remaserasi selama empat hari hingga bening, selanjutnya disaring kedalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan menggunakan evaporator dibawah titik didih samapi diperoleh ekstrak kental.

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Berat simplisia yang diekstrak (g)}} \times 100 \%$$

3.5 Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa-senyawa metabolit sekunder dalam daun remek daging secara kualitatif. Skrining fitokimia serbuk simplisia dan sampel dalam bentuk basah meliputi pemeriksaan kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid/steroid, tannin dan saponin, senyawa-senyawa tersebut dapat diidentifikasi dengan pereaksi dan memberikan setiap ciri khas setiap golongan metabolit sekunder (Harbone, 1987).

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 4 gram sampel ditambahkan 10 mL ammonia. Larutan disaring ke tabung reaksi dan difiltrat kemudian ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 2N. Campuran dikocok dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas dipindahkan kedalam tabung reaksi dan masing-masing diisi kurang lebih 1 mL, selanjutnya ditambahkan pereaksi Mayer, jika terdapat endapan berwarna putih mengidentifikasi adanya alkaloid didalam sampel tersebut (Harbone, 2007).

2. Uji Flavonoid

Sampel diekstrak dengan metanol dan dipanaskan didalam tabung reaksi. Tabung reaksi tersebut ditambahkan serbuk magnesium dan asam klorida pekat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah (Harbone, 2007).

3. Uji Saponin

Sebanyak 2 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL akuades lalu dikocok selama 30 detik, diamati perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk buih (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya saponin (Marliana et al, 2005).

4. Uji Tanin dan Fenolik

Sampel dirajang halus kemudian diekstrak dengan metanol dalam tabung reaksi. Hasil ekstrak ditetesi 2-3 tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Adanya perubahan warna biru kehijauan menunjukkan tanin dan hijau kekuningan menunjukkan fenolik (Harbone, 2007).

5. Uji Triterpenoid dan Steroid

Sampel dihaluskan dan diekstrak dengan asam asetat glasial. Hasil dari ekstrak dipindahkan dengan pipet tetes ke dalam dua tabung reaksi. Kemudian masing masing tabung reaksi ditambahkan asam sulfat pekat . Adanya perubahan warna hijau kebiruan menunjukkan triterpenoid dan perubahan warna hijau menunjukkan steroid (Harborne, 2006).

3.7 Fraksinasi Dengan Kromatografi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Pemisahan jumlah dan jenisnya senyawa menjadi fraksi yang berbeda tergantung pada jenis tumbuhan. Senyawa yang bersifat polar ditarik ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat nonpolar dimasukkan ke pelarut nonpolar (Harborne 1987).

3.8.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah metode yang umum digunakan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa untuk tujuan kualitatif dan pemisahan senyawa dalam jumlah besar. (Mutiasari, 2012). Prinsip dari KLT di mana suatu analit bergerak melintasi lapisan fase diam di bawah pengaruh fase gerak, yang bergerak melalui fase diam. Semakin polar suatu senyawa fase gerak, semakin besar partisi ke dalam fase diam gel silika, semakin sedikit waktu yang dibutuhkan fase gerak untuk bergerak menyusuri plat sehingga semakin pendek jarak tempuh senyawa tersebut menaiki plat dalam waktu tertentu (Watson, 2005).

3.8.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan eluen bertingkat kepolarannya diantaranya yaitu n-heksana, etil asetat dan metanol. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel sebanyak 250 gr yang diaktivasi menggunakan oven dengan suhu 110⁰ selama 2 jam. Silika gel (60 F 254 merck 1.05554.0001) yang diaktivasi dengan cara dibuburkan dengan pelarut n-heksana dan dikondisikan selama 24 jam. Kemudian eluen ditampung dengan vial 10 ml eluen pervial, masing-masing vial diuapkan dengan cara diangin-anginkan dan dilakukan uji KLT diamati dengan lampu UV 254 nm dan 365 nm, vial yang mempunyai spot noda yang sama lalu digabungkan dan dilakukan pemishan lanjutan.

3.8.3 Pemurnian Kromatografi Kolom Sephadex

Kromatografi kolom sephadex menggunakan sephadex LH-20 sebanyak 10 gr, sephadex dibuburkan terlebih dahulu menggunakan metanol 100% dan diamkan didalam kolom tunggu selama 24 jam. Kemudian eluen ditampung dengan vial 10 ml eluen pervial, masing-masing vial diuapkan dengan cara diangin-anginkan dan dilakukan uji KLT diamati dengan lampu UV 254 nm dan 365 nm, vial yang mempunyai spot noda yang sama lalu digabungkan dan dilakukan skrining fitokimia pada sampel untuk memastikan golongan senyawa.

