

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian:

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental meliputi penyiapan alat, bahan dan pereaksi, pengumpulan dan pengolahan simplisia, dan skrining fitokimia.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian : Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran
Universitas Tarumanagara Jakarta

Waktu penelitian : 14 September 2013-10 Mei 2014

3.3 Alat dan bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi tabung reaksi, gelas kimia, corong pisah, lumpang porselen, batang pengaduk, corong, neraca, penjepit tabung reaksi, penangas air, kertas saring, kapas, *aluminium foil*, rak tabung reaksi, *blender*, pipet tetes, erlenmeyer, plat tetes, batang pengaduk, kaki tiga, *rotary evaporator*, spatula, gelas ukur, pisau, gunting, jerigen plastik.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi rimpang lengkuas merah segar, serbuk rimpang lengkuas merah kering, NaOH 10%, kloroform, metanol, amoniak, etanol, aseton, pelarut: n-heksan, H₂SO₄ 2 N, diklorometana, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Shinoda, pereaksi Wagner, pereaksi Liebermann-Burchard, amil alkohol, HCl, FeCl₃ 1%, asam asetat anhidrat, akuades, eter, bubuk magnesium.

3.4 Prosedur Kerja Penelitian

3.4.1 Determinasi Tumbuhan

Identifikasi/ determinasi tumbuhan dilakukan di Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor, Indonesia. Hasil identifikasi tumbuhan dapat dilihat pada lampiran 2.

3.4.2 Uji Fitokimia Sampel Segar Tumbuhan

Penelitian uji fitokimia sampel segar secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa metabolit sekunder dari sampel segar tumbuhan (rimpang lengkuas merah). Pengujian dilakukan terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, fenolik/ tanin, steroid dan terpenoid.

3.4.2.1 Identifikasi Golongan Senyawa Alkaloid^{39,40}

- Sampel segar \pm 4 gr ditumbuk sampai halus di lumpang porselen
- Ditambahkan 20 ml kloroform dan 3 ml amoniak, digerus lagi dan disaring pakai kapas dengan pipet
- Filtrat ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes, dikocok dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan
- Lapisan bagian atas diambil, kemudian dipindahkan pada 3 tabung reaksi
- Kepada masing-masing tabung reaksi ditambahkan pereaksi Dragendorff, Meyer, dan pada tabung ketiga tambahkan akuades 1-2 tetes sebagai kontrol
- Jika sampel mengandung alkaloid akan terbentuk berturut-turut endapan jingga dan putih

3.4.2.2 Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid³⁹

- Sampel segar sebanyak \pm 4 gr dihaluskan, dimasukan ke dalam tabung reaksi dan diekstraksi dengan eter
- Ekstrak disaring dan ditambahkan 2 ml NaOH 10%, kemudian dikocok 1-2 menit
- Biarkan sampai terbentuk 2 lapisan

- Larutan sebelah bawah yang berupa natrium fenolat diambil, lalu ditambahkan ± 5 tetes HCl 2 N dan 2-3 ml eter, dikocok, dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan larutan
- Larutan sebelah atas atau larutan eter diambil dan dipindahkan ke dalam 2 tabung reaksi, kemudian tambahkan etanol ke dalam salah satu tabung, sedangkan tabung yang lain sebagai pembandingnya
- Selanjutnya dilakukan uji dengan pereaksi Shinoda dengan menambahkan 0,1 gr logam magnesium dan 1 ml HCl pekat pada tabung 1
- Apabila terbentuk endapan/ larutan merah menunjukkan adanya flavonoid

3.4.2.3 Identifikasi Golongan Senyawa Saponin⁴¹

- Sampel segar sebanyak ± 4 gr dihaluskan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Tambahkan 5 ml akuades lalu dikocok secara kencang
- Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih/busa yang stabil

3.4.2.4 Identifikasi Golongan Senyawa Fenolik/ Tanin^{39,41}

- Sampel segar sebanyak ± 4 gr dihaluskan
- Setelah itu dilarutkan dengan 10 ml metanol, lalu haluskan lagi dan saring
- Masukkan ke dalam 2 tabung reaksi
- Pada tabung 1 beri 1-3 tetes pereaksi FeCl_3 1%
- Uji positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna biru atau biru ungu/ungu tua, tabung 2 sebagai kontrol

3.4.2.5 Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dan Triterpenoid³⁹

- Sampel segar ± 4 gr dihaluskan
- Tambahkan 10 ml kloroform, haluskan lagi, dan saring
- Masukkan ke dalam 3 lubang plat tetes dan biarkan sampai kering
- Selanjutnya tambahkan beberapa tetes asam asetat anhidrat lalu aduk dan tambahkan H_2SO_4 pekat

- Apabila mengandung steroid akan ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru
- Adanya terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu

3.4.3 Pengumpulan dan Pengolahan Sampel Kering Tumbuhan

Rimpang lengkuas merah dibersihkan, kemudian dipotong-potong tipis, dikeringkan dengan cara tidak langsung terkena matahari, lalu *diblender* hingga didapatkan 200 g serbuk dari rimpang lengkuas merah kering.



Gambar 3.1 Serbuk hasil rimpang lengkuas merah kering yang *diblender*

3.4.4 Pembuatan Ekstrak dari Sampel Kering tumbuhan

- Serbuk hasil rimpang lengkuas merah kering yang telah *diblender* sebanyak 200 g, diekstraksi maserisasi (perendaman) selama 3 hari dengan pelarut heksan, lalu keesokan harinya (hari ke-4) ditampung hasil ekstrak sampel keringnya. Proses tersebut dilakukan sebanyak 3x pengulangan.

- Hasil tampungan pertama dan kedua dimasukkan ke jerigen plastik yang telah disediakan. Saat memasukkan ke jerigen, ekstrak sampel keringnya disaring dengan bantuan kertas saring dan corong.
- Setelah proses ekstraksi, dilanjutkan proses evaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada ekstrak dari sampel kering tersebut.



Gambar 3.2 Proses Maserasi



Gambar 3.3 Proses Evaporasi

3.4.5 Uji Fitokimia Ekstrak dari Sampel Kering

Penelitian uji fitokimia ekstrak dari sampel kering secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak sampel kering tumbuhan (rimpang lengkuas merah). Pengujian dilakukan

terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik/ tanin, steroid dan terpenoid.



Gambar 3.4 Ekstrak hasil evaporasi dan bahan untuk uji fitokimia

3.4.5.1 Identifikasi Golongan Senyawa Alkaloid^{39,40}

- Ekstrak sampel kering ditambahkan 2 ml kloroform dan amoniak 2 tetes, kemudian dikocok
- Ambil lapisan bawah, kemudian ditambahkan 1 ml H₂SO₄ 2 N, dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan
- Lapisan bagian atas direaksikan dengan pereaksi Meyer & Dragendorff. Jika sampel mengandung alkaloid akan terbentuk berturut-turut endapan putih dan jingga

3.4.5.2 Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid³⁹

- Ekstrak sampel kering sebanyak 1 ml ditambahkan 1 ml eter kemudian kocok, dan diamkan
- Ambil lapisan atas (eter) dan pindahkan ke tabung reaksi lain, tambahkan NaOH 1 N dan kocok

- Tambahkan 1 ml HCl pekat sampai warna hilang, kemudian tambahkan eter
- Pindahkan lagi ke tabung lain dan ditambah 1 ml amil alkohol, kocok dan tambahkan sedikit bubuk magnesium dan HCl pekat
- Bila ada flavonoid maka akan berwarna merah kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol

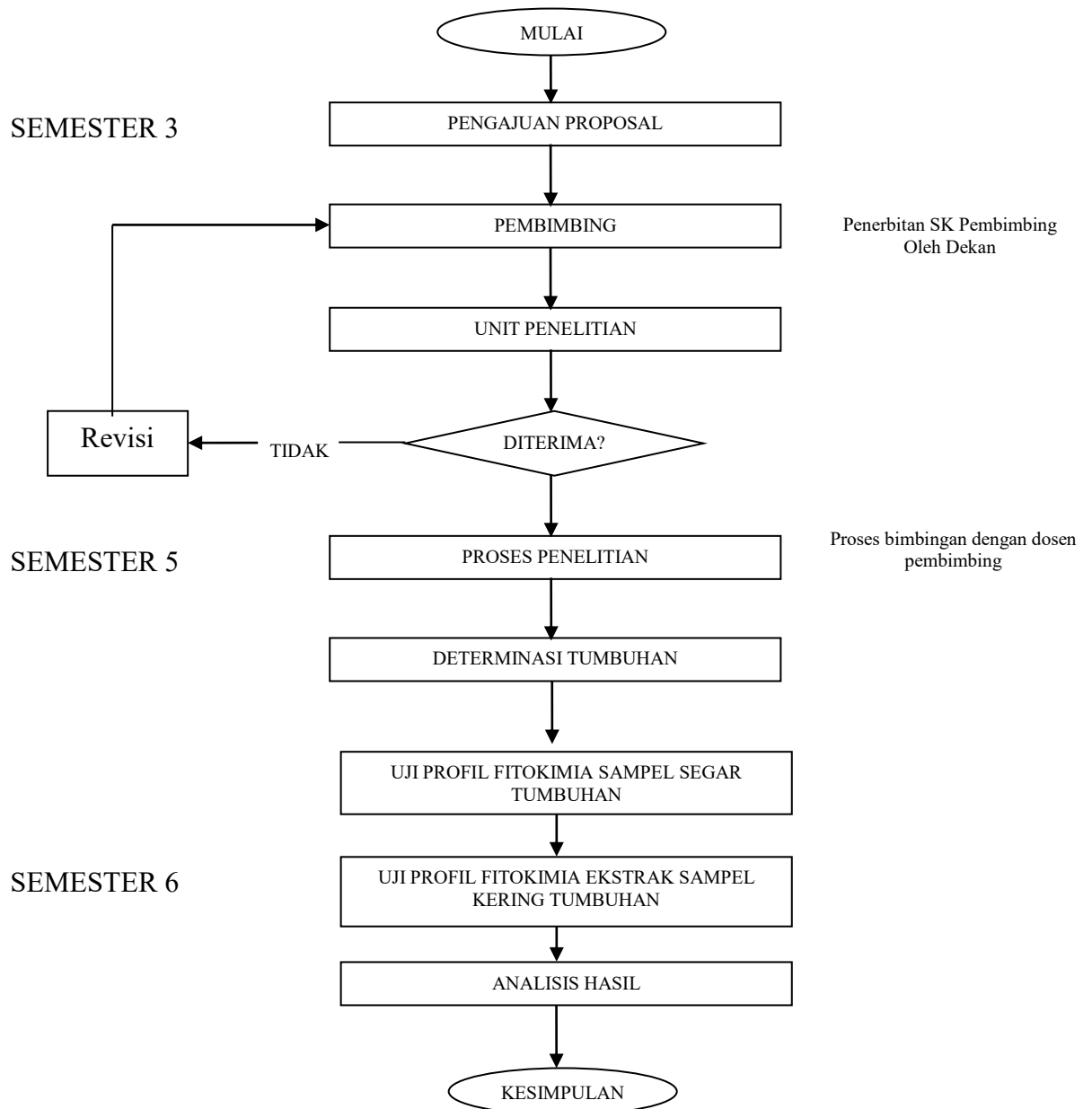
3.4.5.3 Identifikasi Golongan Senyawa Fenolik/ Tanin^{39,41}

- Ekstrak sampel kering sebanyak 1 ml ditambahkan etanol dan larutan FeCl₃ 1%
- Adanya fenolik ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau biru ungu/ ungu tua

3.4.5.4 Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dan Terpenoid³⁹

- Ekstrak sampel kering ditambahkan 1 ml kloroform kemudian kocok dan ambil lapisan bawah, kemudian diteteskan pada plat tetes lalu keringkan
- Selanjutnya ditambahkan 2-3 tetes asam asetat anhidrat
- Adanya steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau-biru
- Adanya terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah-ungu
- Bila terdapat keduanya akan terbentuk warna merah-biru-ungu dengan terbentuk cincin di tengahnya

3.5 Alur Penelitian



3.6 Jadwal Pelaksanaan

2012												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Penentuan topik				x	x							
Studi literatur							x	x	x	x	x	x
Proposal								x	x	x	x	x
Persetujuan proposal											x	x

2013												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Penelitian									x	x	x	x

2014												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Penelitian	x	x	x	x	x							
Pengolahan Hasil Penelitian		x	x	x	x	x						
Penulisan laporan penelitian		x	x	x	x	x	x	x	x			
Pengajuan sidang skripsi												x

2015												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sidang skripsi	x											