

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksploratif laboratoris dengan tema Biologi Farmasi menggunakan metode ekstraksi maserasi dan teknik kromatografi, spektrofotometri UV-Vis dan *GC-MS*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitomedisin dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan April 2016 sampai dengan Oktober 2016.

C. Instrumen Penelitian

1. Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang *Aegle marmelos* Correa yang berasal dari Wates Kulonprogo, etanol 96% (One Med[®]), pelarut n-heksan (PT. BRATACO), etil asetat (PT. BRATACO), alumunium foil, HCl (Merck[®]), Kloroform (PT. BRATACO), asam asetat anhidrat (Merck[®]), asam sulfat pekat (Merck[®]), NaOH PT. BRATACO, Silika gel serbuk (Merck[®]), *glaswool*, Plat KLT Silika gel GF₂₅₄ (Merck[®]).

2. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan digital (*Mettler Toledo*), Gelas pengaduk, Gelas ukur (Iwaki Pyrex[®]), Pipet tetes, Pipet volume (Iwaki Pyrex[®]), Bejana, Kertas saring, *Rotary Evaporator* (IKA[®]) RV 10, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu[®]), Corong pisah (HERMA[®]), Erlenmeyer (Iwaki Pyrex[®]), pipet kapiler, *Beaker glass* (Iwaki Pyrex[®]), *Waterbath* (Mettler[®]), Cawan porselen, Tabung kolom (Iwaki Pyrex[®]), penyangga kolom, tabung reaksi (Iwaki Pyrex[®]), rak tabung reaksi, *TLC Scanner 4* (Camag[®]), *GC-MS QP2010S* (Shimadzu[®]).

D. Prosedur kerja

1. Determinasi

Determinasi terhadap tanaman *Aegle marmelos* Correa dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

2. Pengumpulan dan penyiapan bahan

Korteks maja dipanen pada bulan April 2016 diambil dari daerah Wates, Kulonprogo, Yogyakarta korteks *Aegle marmelos* Correa dibersihkan dan dipisahkan dengan batangnya, selanjutnya dikeringkan dengan cara dijemur pada sinar matahari dengan ditutup kain berwarna hitam, setelah kering kemudian korteks maja dihaluskan dengan mesin penghalus sampai menjadi serbuk.

3. Penentuan *marker* analitik

Penentuan *marker* analitik dilakukan dengan cara membuat ekstrak korteks maja dengan perbandingan berbagai pelarut, pelarut yang digunakan adalah kloroform, n-heksan, etanol 96% dan etil asetat. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi dalam jumlah kecil menggunakan tabung reaksi selama 2 jam dengan dilakukan pengadukan setiap 30 menit. Ekstrak disaring menggunakan kertas saring, kemudian pelarut diuapkan untuk membuat ekstrak yang lebih pekat. Masing-masing ekstrak dianalisis menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak n-heksan: etil asetat hasil optimasi fase gerak. Kemudian plat KLT dilakukan penyemprotan pereaksi *Liebermann-Burchard* untuk mengidentifikasi steroid.

4. Pembuatan larutan pereaksi *Liebermann-Burchard*

Pembuatan larutan pereaksi *Liebermann-Burchard* harus dibuat baru dengan cara menambahkan 5 ml asam asetat anhidrat ke dalam 5 ml asam sulfat pekat pelan-pelan, kemudian dengan hati-hati tambahkan etanol absolut sampai volume 50 ml, lalu didinginkan dengan air es (Mulyono, 2009).

5. Optimasi fase gerak

Optimasi fase gerak dilakukan dengan membuat perbandingan dua fase gerak atau eluen antara n-heksan: etil asetat (1:1) dengan n-heksan: etil asetat (2:1). Pembuatan fase gerak dilakukan dengan mencampurkan kedua eluen n-heksan dan etil asetat ke dalam bejana, kemudian dilakukan

penjenuhan dengan menggunakan kertas saring. Eluen dinyatakan jenuh jika eluen telah membasahi seluruh kertas saring.

Untuk mengetahui perbandingan eluen yang baik dari kedua perbandingan diujikan dengan melihat hasil pemisahan bercak senyawa ekstrak yang sudah ditotolkan pada plat KLT. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dalam jumlah kecil menggunakan tabung reaksi selama 2 jam dengan dilakukan pengadukan setiap 30 menit. Saring ekstrak menggunakan kertas saring, kemudian pelarut diuapkan untuk membuat ekstrak yang lebih pekat. Proses elusi dilakukan sampai eluen mencapai batas pada plat KLT.

6. Pembuatan ekstrak korteks *Aegle marmelos* Correa.

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi, serbuk halus korteks *Aegle marmelos* Correa direndam dengan menggunakan cairan penyari etanol 96% dalam bejana tertutup rapat. Tahap maserasi dilakukan selama 2 hari disertai pengadukan secara periodik untuk memberi kesempatan zat aktif berdifusi ke dalam pelarut. Setelah maserasi selama 2 hari, dilakukan penyaringan ekstrak dengan menggunakan kain flanel dan ampas dimaserasi kembali dengan memakai cairan penyari yang baru. Hasil maserasi pertama digabungkan dengan maserasi kedua, ekstraksi ini menghasilkan cairan atau maserat. Cairan atau maserat tersebut selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga terbentuk ekstrak kental.

7. Pemisahan dengan kromatografi kolom

Ekstrak korteks maja yang sudah dikentalkan dilakukan pemisahan dengan cara kromatografi kolom gravitasi dengan menggunakan fase diam berupa silika gel serbuk dan fase gerak campuran n-heksan: etil asetat (2:1) secara bergradien. Kromatografi kolom dilakukan dengan cara tabung yang digunakan sebagai kolom diberi *glasswool* pada bagian bawah kolom yang berfungsi sebagai penyaring dan penghambat fase diam supaya tidak terbawa fase gerak, kemudian silika gel serbuk dimasukkan ke dalam kolom sebagai fase diam. Dilakukan penjenuhan fase diam dengan cara masukkan fase gerak ke dalam kolom kemudian tunggu sampai fase gerak turun dan membasahi seluruh silika gel didalam kolom. Tahap berikutnya adalah memasukkan ekstrak yang sudah dilarutkan dengan etanol 96% ke dalam kolom. Teknik pemisahan pada kromatografi kolom berdasarkan warna yang dilihat secara visual dan pada sinar UV. Hasil pemisahan ditampung pada tabung reaksi berdasarkan warna yang terpisah.

8. Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis

Fraksi hasil dari tahap kromatografi kolom sebelumnya selanjutnya diuji pada kromatografi lapis tipis dengan menggunakan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam dan n-heksan: etil asetat (2:1) sebagai fase gerak. Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan cara menotolkan masing-masing fraksi hasil kromatografi kolom pada plat KLT menggunakan pipet kapiler, kemudian elusi menggunakan fase gerak yang sudah dijenuhkan. Elusi

dihentikan pada saat fase gerak mencapai batas atas pada plat KLT. Hasil dari masing-masing fraksi pada plat KLT kemudian dilakukan pembacaan menggunakan sinar UV 254 dan UV 366.

9. Analisis dengan *TLC Scanner*

TLC scanner berfungsi untuk melihat hasil pemisahan dari senyawa yang dipisahkan oleh kromatografi lapis tipis. Hasil yang ditampilkan berupa kurva grafik dan angka di dalam tabel dengan cara hasil dari KLT yang telah didapatkan pada plat silika di letakkan pada alat *TLC scanner* kemudian dilakukan pembacaan sampai hasil keluar pada monitor yang terhubung pada alat *scanner* data.

10. Analisis dengan Spektrofotometri UV-Vis

Analisis spektrofotometri UV-Vis bertujuan untuk menetapkan panjang gelombang absorpsi maksimum (λ_{maks}) dan nilai absorbansi dengan cara fraksi sampel senyawa steroid hasil kromatografi kolom di masukkan pada kuvet kemudian dilakukan *scanning* menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang antara 300-800 nm. Blanko yang digunakan adalah aquadest.

11. Analisis dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*

Analisis dengan *GC-MS* dilakukan dengan menginjeksi 1 μ L larutan ke dalam tempat injeksi. Uap cuplikan ini kemudian dibawa oleh gas pembawa masuk ke dalam kolom. Kolom akan memisahkan komponen-komponen steroid sehingga dapat dideteksi oleh detektor dan dihasilkan suatu kromatogram. Identifikasi komponen-komponen senyawa kimia

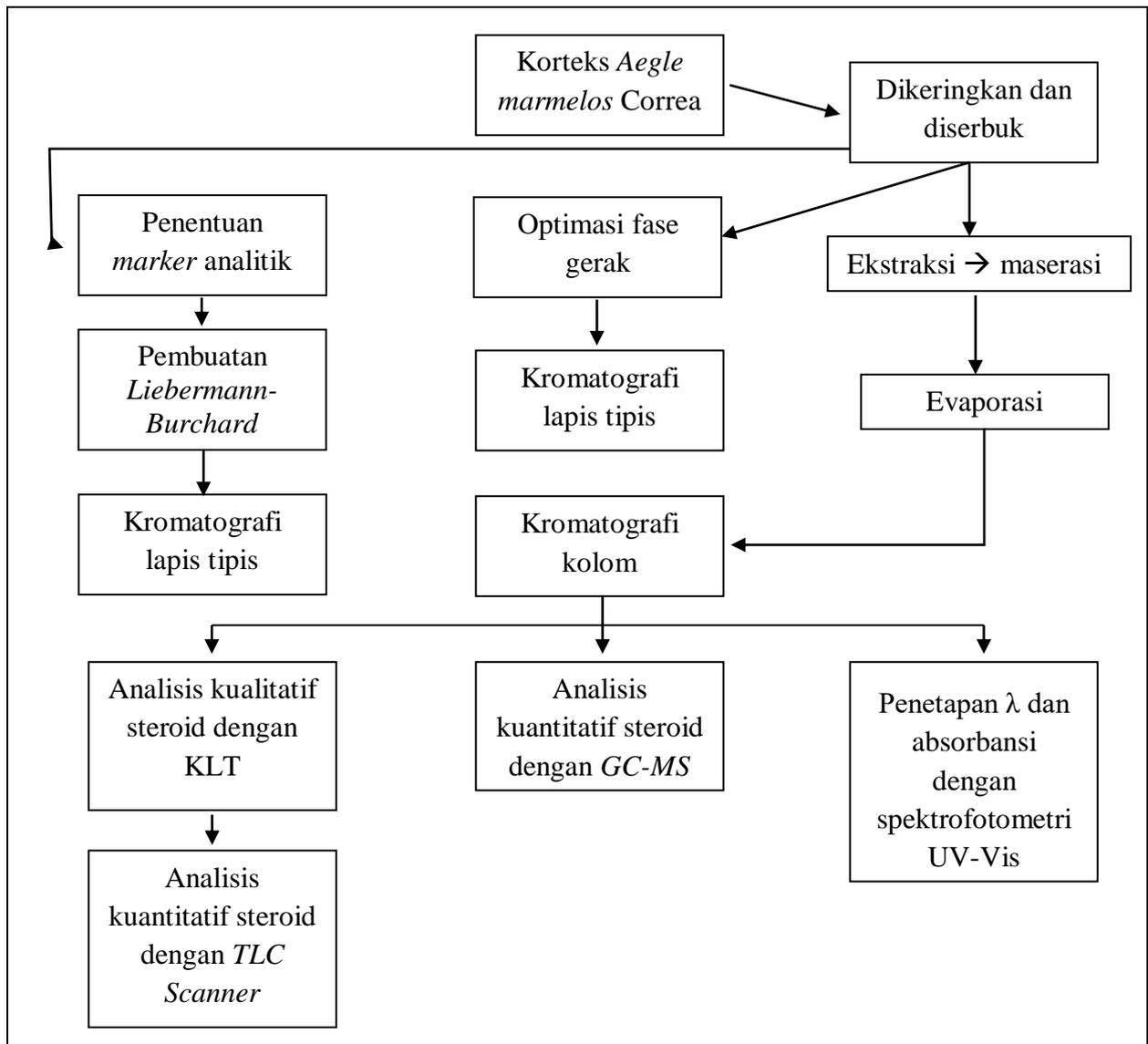
dalam steroid korteks maja menggunakan instrumen *GC-MS* pada kondisi yang ditentukan sebagai berikut:

Kolom	: AGILENT HP 1MS
Panjang	: 30 meter
ID	: 0,25 mm
Gas pembawa	: Helium
Suhu kolom oven	: 70,0 ⁰ C
Suhu injeksi	: 310 ⁰ C
Mode injeksi	: Split
Tekanan	: 13,7 kPa
Total gelombang	: 20,0 mL/menit

Analisis ini dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa-senyawa steroid dalam fraksi korteks *Aegle marmelos* Correa menggunakan fase gerak gas pembawa helium dengan kecepatan 0,50 ml/menit. Sistem pemanasan diatur dari suhu 70 hingga 300⁰C dengan peningkatan sebesar 5⁰C setiap menit. Dalam instrumen spektra massa digunakan energi ionisasi sebesar 70 Ev. Hasilnya akan diamati melalui spektra yang diinterpretasikan berdasarkan berat molekul dan waktu retensi senyawa yang dituju.

E. Skema langkah kerja

Secara umum skema penelitian ini sebagai berikut :



Gambar 11. Skema langkah kerja

F. Data dan Analisis data

Pada isolasi ini data yang diperoleh adalah mendapatkan senyawa steroid korteks *Aegle marmelos* Correa. Dalam memperoleh senyawa steroid digunakan metode ekstraksi maserasi dan difraksinasi menggunakan

kromatografi kolom yang selanjutnya dianalisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT), spektrofotometri UV-Vis dan *GC-MS*.

1. Identifikasi steroid dengan pereaksi *Liebermann-Burchard*

Hasil identifikasi steroid menggunakan pereaksi *Liebermann-Burchard* berupa bercak berwarna ungu kemerahan pada plat KLT setelah dilakukan penyemprotan pereaksi.

2. Optimasi fase gerak

Hasil optimasi fase gerak yang diperoleh berupa 2 perbandingan KLT yang dianalisis menggunakan sinar tampak dan sinar UV 254 nm, dengan melihat perbandingan hasil pemisahan bercak pada kedua plat silika gel pada KLT.

3. Identifikasi steroid dengan fraksinasi kromatografi kolom

Hasil yang diperoleh pada fraksinasi kromatografi kolom berupa fraksi-fraksi cairan eluen yang pemisahannya berdasarkan warna. Selanjutnya fraksi-fraksi tersebut dianalisis menggunakan KLT untuk melihat kemurnian masing-masing fraksi yang diduga senyawa steroid.

4. Identifikasi senyawa steroid maha dengan KLT dan *TLC Scanner*

Hasil KLT yang diperoleh dilihat dibawah sinar tampak, UV 254 nm, UV 366 nm, selanjutnya diaplikasikan dengan *TLC Scanner* untuk mendapatkan hasil berupa puncak (*peak*) dan nilai *Rf* masing-masing senyawa.

5. Identifikasi senyawa steroid dengan spektrofotometer UV-Vis

Hasil yang diperoleh adalah berupa spektra panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang yang diperoleh merupakan panjang gelombang dari senyawa steroid yang terkandung dalam korteks maha.

6. Identifikasi senyawa steroid dengan GC-MS

Metode *GC-MS* dilakukan dengan cara melihat spektra dan mengamati waktu retensi setiap senyawa yang timbul berupa puncak (*peak*) yang akan mengidentifikasi jenis senyawa yang terkandung pada sampel uji.