III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari sampai Juni 2010 di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Analisis dilakukan di Laboratorium Biomassa Universitas Lampung dan Laboratorium Terpadu UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta. Identifikasi atau determinasi sampel di Laboratorium Biologi Farmasi UII Yogyakarta.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 1 kg serbuk akar tumbuhan akar wangi dan hama rayap kayu (*Cyrptotermes* sp.). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dan kromatografi adalah *n*-heksana, aseton, etil asetat, diklorometana, kloroform, metanol, larutan pereaksi Liebermann-Burchard (anhidrida asetat : asam sulfat pekat, 1:1) yang digunakan sebagai penampak bercak pada noda KLT dan uji pendahuluan terpenoid, plat KLT silika gel 60 F_{254} 0,25 mm untuk kromatografi lapis tipis, silika gel Merck 60 (10-40 μm) untuk

impregnasi dan kromatografi kolom gravitasi, serta silika gel Merck 60 GF_{254} (63-200 μm) sebagai fase diam pada KCV.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas berbagai ukuran, penguap vakum putar, satu set alat destilasi, satu set alat sokletasi, satu set alat kromatografi kolom, satu set alat kromatografi cair vakum, pipet kapiler, lampu UV, bejana pengembang, Spektrofotometer FT-IR merk Varian, dan GC-MS merk AGILENT GC 6890N 5975B MSD.

C. Prosedur Kerja

1. Pengambilan dan Persiapan Sampel

Sampel berupa akar tumbuhan akar wangi dalam keadaan basah didapat dari pasar Bringharjo Yogyakarta, kemudian dibersihkan dan dikeringanginkan. Setelah kering, sampel digunting kecil untuk memperkecil ukuran sampel dan digiling hingga berbentuk serbuk.

2. Proses Ekstraksi

Serbuk akar tumbuhan akar wangi diekstraksi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana hingga diperoleh ekstrak kasar yang diinginkan. Ekstraksi dilakukan dengan metode sokletasi selama 20 x 3 jam pada suhu penangas 70-80°C. Sehingga suhu dalam labu soklet berkisar titik didih n-heksana (68°C). Ekstrak disaring dengan menggunakan corong dan kapas, kemudian dipekatkan dengan menggunakan penguap putar vakum pada temperatur ruang dengan laju putar 40-

60 rpm dan tekanan rendah (vakum). Sampel yang telah dipekatkan kemudian dikeringkan hingga pelarutnya menguap dan ditimbang massanya. Ekstrak pekat kemudian diambil sebagian untuk dilakukan penapisan fitokimia (uji pendahuluan terpenoid) dan uji aktifitas terhadap hama rayap. Setelah diketahui bahwa ekstrak tersebut aktif, lalu dilakukan uji KLT untuk melihat pola pemisahan komponen-komponen yang terkandung di dalamnya.

3. Uji Pendahuluan Terpenoid

Uji Pendahuluan terpenoid dilakukan terhadap hasil ekstrak yang telah dipekatkan, kemudian diuji dengan pereaksi Liebermann-Burchard (anhidrida asetat : asam sulfat pekat, 1:1) secara langsung dan KLT. Uji secara langsung dilakukan dengan cara, ekstrak pekat diambil 1 mL kemudian ditambahkan 3 tetes anhidrida asetat dan dibiarkan sampai kering. Kemudian ditambahkan 3 tetes asam sulfat pekat. Sedangkan uji dengan KLT dilakukan dengan cara, menotolkan ekstrak pada plat KLT. Kemudian dielusi dengan eluen (n-heksana : etilasetat) dan divisualisasi dengan pereaksi Liebermann-Burchard (anhidrida asetat : asam sulfat pekat, 1:1). Uji positif jika terjadi perubahan warna merah sampai ungu (Harbone, 1996).

4. Uji Bioaktifitas

Uji bioaktifitas dilakukan dengan tujuan mengetahui pengaruh ekstrak akar wangi sebagai penolak hama serangga rayap. Uji bioaktifitas dilakukan pada ekstrak kasar dan senyawa murni hasil tahapan pemurnian dengan menggunakan metode percobaan pilihan (Syahputra, 2001), yaitu hama uji *Cyrptotermes* sp. diberi

pilihan makan dengan dan tanpa ekstrak. Pada cawan petri diletakkan 3 kayu pada tiap sisi dengan jarak yang sama, yaitu kayu yang dicampur dengan ekstrak atau senyawa sebagai bahan uji, kayu dengan aseton (pelarut ekstrak) yang telah diuapkan (sebagai blangko) dan kayu tanpa perlakuan (kontrol untuk melihat pengaruh aseton pada rayap). Menurut Ohmura *et al* (2000) ekstrak uji dilarutkan dalam aseton karena tidak berpengaruh terhadap rayap.

Kemudian pada setiap cawan tersebut diberikan 20 ekor hama rayap *Cyrptotermes* sp. yang dipuasakan terlebih dahulu selama 1 jam. Perlakuan tersebut untuk mendapatkan uji yang valid karena pada keadaan lapar hama cenderung mencari sumber makanan. Selanjutnya diamati kecenderungan gerak dari hama tersebut selama 10 jam. Apabila hama cenderung bergerak menjauhi bahan uji maka disebut uji positif dan dihitung indeks ketertarikan ekstrak atau senyawa. Respon dari hewan uji dipelajari dengan menghitung jumlah hewan uji pada setiap sisi. Dari data yang diperoleh, kemudian dihitung persentase ketertarikan dan indeks ketertarikan (*attractive index*) dengan menggunakan persamaan berikut:

a. % Ketertarikan = $\frac{\sum \text{serangga yang tertarik}}{\sum \text{serangga yang dilepaskan}}$ x 100%

b. AI = $\frac{\sum \text{serangga yang tertarik} - \sum \text{serangga pada blanko}}{\sum \text{serangga yang dilepaskan} - \sum \text{serangga pada blanko}}$

dengan AI adalah indeks ketertarikan (*attractive index*) yang menyatakan daya ketertarikan suatu senyawa. Nilai AI dan % ketertarikan suatu senyawa berbanding terbalik dengan daya *repellent*. Semakin kecil nilai AI dan

% ketertarikan suatu senyawa, maka daya *repellent* senyawa tersebut akan semakin besar (Narayanan dan Nadarajan, 2005).

5. Pemisahan dan Pemurnian

Ekstrak pekat yang didapat dikeringkan, ditimbang massanya dan diuji bioaktifnya terhadap rayap. Ekstrak Aktif dipisahkan dan dimurnikan menggunakan kromatografi kolom cair vakum. Untuk mengetahui sistem pelarut yang akan digunakan pada kromatografi kolom, terlebih dahulu dilakukan uji KLT menggunakan eluen dengan perbandingan tertentu dari sistem eluen non polar dinaikan kepolarannya hingga bersifat polar, sebelum KCV dilakukan. KLT juga digunakan untuk mengetahui jumlah komponen dan kemurnian sampel yang dianalisis.

Kromatografi kolom dilakukan dengan beberapa gram silika gel 60 GF_{254} dimasukkan ke dalam kolom kromatografi, diketuk-ketuk sambil divakumkan. Kemudian silika dialiri dengan *n*-heksana sampai tidak terdapat rongga udara, permukaan rata, dan kerapatan silika gel di dalam kolom sama. Ekstrak kasar hasil sokletasi di impregnasi dengan silika gel Merck 60 kemudian dimasukkan ke dalam kolom kromatografi. Sampel dielusi dengan pelarut mulai dari pelarut dengan kepolaran terendah sampai kepolaran tertinggi dengan perbandingan yang semakin ditingkatkan kepolarannya.

Hasil fraksi yang diperoleh kemudian diuji KLT kembali dengan menggunakan lampu UV dan pereaksi penampak bercak Libermann-Burchard. Fraksi dengan pola pemisahan yang sama digabungkan. Fraksi-fraksi kemudian di KLT dan

dikromatografi kolom kembali hingga didapatkan pemisahan yang baik dan diperoleh senyawa yang murni.

6. Uji Kemurnian

Uji kemurnian dilakukan dengan metode KLT. Uji kemurnian secara KLT menggunakan beberapa variasi campuran eluen. Kemurnian suatu senyawa ditunjukkan dengan timbulnya satu noda pada 3 nilai Rf yang berbeda yaitu, sekitar 0,2; 0,5 dan 0,7. Pengamatan noda dilakukan di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan kemudian dicelup pada Liebermann-Burchard untuk menampakkan bercak / noda dari komponen senyawa tersebut.

7. Identifikasi Senyawa

7.1 Spektrofotometri Inframerah

Senyawa hasil isolasi berupa minyak di campur bersama halida anorganik KBr. Kemudian digerus dan dibentuk menjadi lempeng tipis atau pellet dengan bantuan alat penekan berkekuatan 7-10 ton persatuan luas. Kemudian pelet tersebut diukur puncak serapannya. Serapan yang didapat berguna untuk mengetahui gugus fungsi yang ada pada senyawa yang dianalisis.

7.2 Spektrofotometri Massa

Senyawa dilarutkan ke dalam pelarut diklorometana, kemudian dilakukan pengukuran dengan Spektrofotometer AGILENT GC 6890N 5975B MSD dengan menggunakan kolom kapiler HP5-MS. Temperatur diprogram 230° C sampai 325° C dengan kenaikan suhu konstan 4° C per menit. Pada saat itu sampel diubah

menjadi keadaan gas kemudian dibombardir dengan elektron yang berenergi cukup untuk mengalahkan potensial ionisasi pertama senyawa tersebut menjadi fragmen kecil, baik berbentuk radikal bebas maupun ion-ion lain. Didapatkan spektrum massa yang merupakan alur kelimpahan muatan (*m/e* atau *m/z*) dari fragmen-fragmen itu. Dari spektrum massa didapat berat molekul dan pola fragmentasi yang terjadi pada senyawa.