

BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat

3.1.1. Lokasi Bahan

Sampel tumbuhan diambil di kawasan pantai desa Morodemak, Kecamatan Bonang, Kabupaten Demak, Jawa Tengah pada bulan Pebruari 1992.

3.1.2. Bahan-bahan Kimia

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi yaitu yang berkualitas teknis, sedangkan untuk keperluan analisis dan kristalisasi digunakan yang berkualitas p.a. Pelarut-pelarut dan pereaksi-pereaksi yang digunakan antara lain adalah :

- Iodium
- Kalium Iodida
- Raksa (II) Klorida
- Asam Acetat Anhidrid
- Asam Sulfat pekat
- Asam Sulfat 2 N
- Natrium Hidroksida
- Asam Klorida
- Eter
- Aceton
- Etanol
- Metanol
- Kloroform
- Benzene

- Etil Acetat
- Silika Gel G 60
- Pereaksi Wagner dan Mayer
- Kalium Bikromat
- Ammonium Hidroksida

3.1.3. Alat-Alat yang Digunakan

- Tabung reaksi
- Plat tetes
- Erlenmeyer
- Lumpang porselin
- Gelas ukur
- Oven listrik
- Corong
- 1 set alat kromatografi kolom
- Neraca analitis
- 1 set peralatan kromatografi lapis tipis
- Penangas air
- Alat penentu titik leleh "Fisher John"
- 1 set perangkat distilasi
- Spektrofotometer infra merah "Hitachi", model 270-50
- Spektrofotometer ultra violet "Hitachi", model 150-20

3.2. Metoda Kerja

3.2.1. Di Lapangan

Tumbuhan yang terdapat di daerah pasang surut pantai Morodemak diambil secara lengkap baik daun, bunga, batang

dan akar, kemudian dibuat spesimen herbariumnya dan juga sekaligus untuk bahan pemeriksaan kandungan kimianya.

Dari hasil survei lapangan diperoleh tiga species tumbuhan utama di pantai Morodemak tersebut dan terhadap ketiga species ini telah dilakukan tindak lanjut di laboratorium.

3.2.2. Di Laboratorium

Identifikasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar PS. Biologi-MIPA, Universitas Diponegoro.

Skrining fitokimia dilakukan terhadap ketiga jenis tumbuhan mangrove yang ada di pantai Morodemak dan isolasi senyawa golongan triterpenoid dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Organik, PS. Kimia-MIPA Universitas Diponegoro. Skrining fitokimia dan isolasi mempergunakan metoda Harborne, J.B. (1984) dan Bell, K.H. (1961).

Analisis struktur dilakukan di Laboratorium Analisis Kimia Fisika Pusat (LAKFIP) Universitas Gadjah Mada.

3.2.2.1. Identifikasi tumbuhan

Identifikasi tumbuhan dilakukan dengan cara membuat herbarium dan menggunakan buku kunci determinasi dari Backer (1963).

3.2.2.2. Penyediaan Pereaksi yang Digunakan untuk Skrining Fitokimia

Pereaksi Mayer :

Dalam erlenmeyer 100 ml dilarutkan raksa (II) klorida

sebanyak 1,36 g dan pada tabung reaksi lainnya dilarutkan 5 g Kalium Iodida (KI) dalam air suling sebanyak 10 ml. Setelah kedua larutan tersebut dicampurkan, kemudian diencerkan sampai volumenya menjadi 100 ml dengan air suling. Kemudian pereaksi ini disimpan dalam botol yang berwarna coklat.

Pereaksi Wagner :

Iodium 2,54 g Kalium Iodida (KI) sebanyak 2 g dilarutkan dalam 10 ml air suling, kemudian larutan ini diencerkan dengan air suling hingga volume keseluruhan menjadi 100 ml. Setelah disaring pereaksi ini disimpan dalam botol yang berwarna coklat.

Pereaksi Liebermann - Burchard :

Pereaksi ini terdiri dari asam sulfat pekat dan asam asetat anhidrid yang disimpan dalam botol terpisah.

3.2.2.3. Penyediaan Peralatan yang Digunakan untuk Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom

Kromatografi Lapis Tipis

Untuk pembuatan kromatografi lapis tipis dipergunakan plat kaca yang berukuran 2,5 X 8 cm. Salah satu permukaannya dilapisi dengan mencelupkan ke dalam silika gel dalam air dengan perbandingan 1 : 1 yang sebelumnya plat kaca dicuci dengan kalium bikromat yang ditambah sedikit asam sulfat pekat, kemudian dibilas sampai bersih dan dikeringkan. Plat kaca yang sudah dilapisi dengan silika gel kemudian diaktifkan dalam oven pada 100^o C selama 1,5 jam.

Kromatografi Kolom

Kolom kromatografi direndam dalam kalium bikromat dan asam sulfat untuk menghilangkan lemak, lalu dicuci dengan detergen dan air suling, dan dikeringkan.

Silika gel G 60 sebagai adsorben diaktifkan pada suhu 110°C dalam oven kemudian didinginkan, lalu dibuat bentuk bubuk dengan pelarut kloroform.

Kolom diklem dengan posisi vertikal, bagian bawah dari kolom diberi kapas atau serat gelas dan pasir yang telah bebas dari asam dan basa. Isi kolom kira-kira setengahnya dengan kloroform, kemudian dimasukkan bubuk silika gel tadi ke dalamnya hingga bubuk habis. Penuhi kolom dengan pelarut, kemudian buka kran sehingga pelarut keluar. Lakukan berulang kali agar molekul silika gel menjadi padat.

3.2.2.4. Pemeriksaan Kandungan Kimia Tumbuhan terhadap Ketiga specimen

Golongan senyawa yang diperiksa adalah alkaloid, triterpenoid, steroid, senyawa fenol dan saponin.

Pengujian Adanya Alkaloid

Sampel kira-kira 4 g dihaluskan dalam lumpang kemudian ditambahkan kloroform secukupnya sambil terus dihaluskan, setelah itu ditambahkan 10 ml NH_4OH dalam kloroform. Filtratnya diambil dengan jalan menyaring ke dalam tabung reaksi. Ke dalam cairan hasil saringan ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes kemudian kocok dengan teratur. Cairan bagian atas (asam sulfat + alkaloid) dipipet dan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi ini ditambah pereaksi

Mayer dan Wagner. Terjadinya endapan setelah penambahan pereaksi tersebut menunjukkan hasil pengujian yang positif (pereaksi Mayer memberikan endapan putih, pereaksi Wagner memberikan endapan coklat).

Sebagai standar dipakai larutan Brucin dalam asam klorida 2 N dengan konsentrasi, 0,01% ; 0,025% ; 0,05% dan 0,1% yang dianggap sebagai + ; ++ ; +++ ; dan ++++.

Pengujian Adanya Golongan Triterpenoid dan Steroid

Sampel sebanyak 50 - 100 mg ditempatkan dalam tabung reaksi. Kemudian diekstrak dengan kloroform ± 15 menit. Larutan hasil ekstrak dipipet dan ditempatkan dalam plat tetes sebanyak 10 tetes serta dibiarkan hingga kering. Setelah itu ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat.

Terbentuknya warna merah ungu menandakan adanya senyawa triterpenoid sedangkan terbentuknya warna biru menunjukkan adanya steroid.

Sebagai standar digunakan serbuk kolesterol (1,0 g) dalam asam asetat anhidrat, ini dianggap sebagai +++ untuk senyawa steroid, sedangkan untuk senyawa triterpenoid digunakan biji mahoni (*Swietenia macrophylla*) sebagai +++ dengan kandungan 0,05% triterpenoid.

Pengujian Adanya Saponin

Sampel kira-kira 2 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan air hingga seluruh sampel terendam dan kemudian dididihkan kira-kira 2-3 menit dan didinginkan dan dikocok kuat-kuat. Adanya buih yang stabil setelah pengo-

cokan selama 30 menit menunjukkan adanya saponin. Sebagai pembanding untuk saponin digunakan lidah buaya (*Aloe spec*). Ukuran + ; ++ ; +++ diberikan berdasarkan tinggi busa yang dihasilkan berturut-turut 1, 2 dan 3 cm.

Pengujian Adanya Senyawa Fenol

Sampel ditambah dengan air suling kemudian dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ke dalam tabung reaksi ini ditambahkan larutan FeCl_3 1 %. Adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam menunjukkan adanya hasil yang positif.

Hasil analisis skrining fitokimia terhadap seluruh bagian diperlihatkan tabel IV.1., IV.2., dan IV.3.

3.2.2.5. Pembuatan dan Pemeriksaan Ekstrak dari Tumbuhan *Avicennia marina* terhadap Senyawa Golongan Triterpenoid

Pembuatan Ekstrak daun dilakukan dengan jalan maserasi. Bahan yang telah ditumbuk halus (500 g) direndam dalam larutan eter selama 2 hari. Ekstrak eter kemudian dipekatkan dengan jalan distilasi hingga volumenya menjadi seperlima dari volume asal.

Pemeriksaan ekstrak eter dilakukan dengan pereaksi Liebermann - Burchard, hasil ekstraksi menunjukkan warna merah ungu yang tajam dan "sedikit" warna biru.

3.2.2.6. Isolasi dan Pemurnian Kandungan Kimia Ekstrak

Ekstrak eter yang telah dikisatkan dikocok dengan NaOH 1 N. Endapan garam yang terbentuk dipisahkan. Kemudian fraksi eter dicuci dengan asam chlorida encer dan dilanjut-

kan dengan aquadest beberapa kali.

Terhadap fraksi eter ini dilakukan pemeriksaan dengan kromatografi lapis tipis (KLT), dengan menggunakan silika gel G.60 sebagai fasa diam dan sebagai fasa geraknya digunakan berbagai pelarut seperti pelarut n-heksana, etanol dan kloroform. Dengan pelarut n-heksana memberikan hasil satu noda, dengan pelarut etanol tidak memberikan pemisahan serta dengan kloroform diperoleh 4 noda dengan harga Rf. 0,93 ; 0,58 ; 0,44 ; dan 0,39.

Ekstrak eter dikisatkan hingga pekat sekali kemudian dilakukan kromatografi kolom. Sebagai pengelusi digunakan kloroform.

Dari hasil kromatografi kolom diperoleh 5 fraksi. Kemudian terhadap masing-masing fraksi ini dilakukan pengujian Liebermann - Burchard. Ternyata hanya fraksi ketiga yang memberikan warna merah ungu tunggal, sedangkan fraksi 1, 2, 4 memberikan warna biru dan merah ungu, sedangkan fraksi 5 tidak memberikan warna.

Kemudian untuk fraksi ketiga, diuapkan pelarutnya dan dikristalisasi dalam etanol panas, kemudian didinginkan. Proses ini diulangi sebanyak 2 kali untuk memperoleh kristal yang benar-benar murni. Kristal yang diperoleh berwarna putih dan berbentuk jarum sebanyak 290 mg.

3.2.2.7. Analisis Hasil Isolasi dengan Kromatografi Lapis Tipis dan Uji Titik Leleh

Uji kemurnian kristal ini dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dua dimensi dan dideteksi dengan uap I_2

(iodium) dan diperoleh satu noda dengan eluent kloroform. Hasil pengujian titik leleh dengan alat penentu titik leleh "Fisher John" diperoleh titik leleh kristal adalah 288-289°C

3.2.2.8. Analisis Spektroskopi Senyawa Hasil Isolasi

Spektrofotometer Ultra Violet

Dilakukan dengan menggunakan alat Spektrofotometer Ultra violet "Hitachi", model 150 - 20 , dan tidak diperoleh panjang gelombang (λ) maksimum dalam pelarut kloroform.

Spektrofotometer Infra Merah

Dilakukan dengan menggunakan alat Spektrofotometer Infra merah "Hitachi", model 270-50 dengan plat KBr. Spektrum infra merah senyawa hasil rekristalisasi dengan etanol memberikan puncak-puncak pada bilangan gelombang ($\bar{\nu}$) : 3298 cm^{-1} (m), 2908 cm^{-1} (k), 2848 cm^{-1} (k), 1638 cm^{-1} (l), 1458 cm^{-1} (m), 1380 cm^{-1} (m) dan 1029 cm^{-1} (m).

Dari data spektrum di atas dilihat adanya puncak-puncak karakteristik antara lain :

3298	cm^{-1} : regang O-H
2908 - 2848	cm^{-1} : regang C-H dari CH_3- , $-\text{CH}_2-$
1638	cm^{-1} : regang C=C yang sangat lemah
1458 - 1380	cm^{-1} : lentur C-H dari CH_3- , $-\text{CH}_2-$
1029	cm^{-1} : regang dan lentur dari C-O alkohol