

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Sampel, Bahan dan Alat

##### 3.1.1. Lokasi Sampel

Sampel tumbuhan diambil di desa Bulu, Kecamatan Jepara, Kabupaten Jepara, Jawa Tengah, pada bulan Juli 1993.

Tumbuhan diambil bunganya, baik yang sudah jatuh maupun yang masih ada di pohon.

##### 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.

Bahan-bahan yang digunakan adalah :

- Asam asetat anhidrat
- Asam sulfat pekat
- Asam sulfat 2 N
- Ammonium hidroksida
- Iodium
- Metanol
- Kloroform
- Kalium bikromat
- Pereaksi Wagner dan Mayer
- Asam klorida
- Etil asetat

- Silika Gel G 60

### 3.1.3. Alat-alat yang Digunakan

- Erlenmeyer
- Gelas Ukur
- Tabung rekasi
- Corong
- Plat tetes
- Lumpang porselen
- 1 set perangkat distilasi
- 1 set alat kromatografi
- neraca analitis
- 1 set peralatan kromatografi lapis tipis
- Oven listrik
- Penangas Air
- Alat penentu titik leleh "Thermoline"
- Spektrofotometer infra merah " Hitachi " model 270-50
- Spektrofotometer ultra violet " Hitachi ", model 150-20
- Spektrofotometer NMR " Jeol PMX 60 "
- Spektroskopi Massa " Jeol JMS DX 303 "

## 3.2. Metode Kerja

### 3.2.1. Di Laboratorium

Identifikasi dan Isolasi senyawa golongan triterpenoid dilakukan di Laboratorium Kimia Organik

Jurusan Kimia MIPA Universitas Diponegoro.

Sedangkan analisis struktur dilakukan di Laboratorium Analisis Kimia Fisika Pusat ( LAKFIP ) Universitas Gajahmada dan di Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga.

### 3.2.1.1. Pembuatan Pereaksi yang Digunakan untuk Identifikasi Golongan Senyawa

#### Pereaksi Liebermann - Burchard ( L.B. )

Pereaksi LB ini terdiri dari asam asetat anhidrid dengan asam sulfat pekat yang disimpan terpisah.

#### Pereaksi Wagner

2,54 g Iodium dan 2 g Kalium iodida ( KI ) dilarutkan dalam 10 ml air suling hingga volumenya menjadi 100 ml. Setelah disaring pereaksi ini disimpan dalam botol yang gelap.

#### Pereaksi Mayer :

1,36 gram Raksa ( II ) Klorida dilarutkan ditambahkan pada larutan 5 g Kalium Iodida ( KI ) dalam 10 ml air suling. Campuran keduanya diencerkan menjadi 100 ml dengan air suling. Disimpan dalam botol berwarna gelap.

### 3.2.1.2. Pembuatan Peralatan yang Digunakan untuk Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom

#### Kromatografi Lapis Tipis

Pada pembuatan KLT ini dipergunakan plat kaca ukuran

2,5 x 8 cm. Salah satu permukaannya dilapisi silika gel yang dilarutkan dalam air dengan perbandingan 1 : 1. Plat kaca yang sudah dilapisi dengan silika gel diaktifkan dengan memanaskan dalam oven selama 1,5 jam pada suhu 100°C.

#### Kromatografi Kolom

Kolom kromatografi dengan diameter tertentu dicuci lemaknya dengan merendamnya dalam kalium bikromat yang dicampur dengan asam sulfat pekat selama beberapa jam, lalu dicuci bersih dengan detergen dan air suling, kemudian dikeringkan.

Sebagai adsorben dipergunakan silika gel G 60 yang diaktifkan pada suhu 110°C dalam oven kemudian didinginkan dengan mendingkannya dalam udara, lalu dibuat bubuk dengan pelarut kloroform.

Kolom kromatografi yang telah bebas lemak diklem dengan posisi vertikal, bagian bawah kolom diberi kapas atau glasswool (serat gelas) dan pasir yang telah bebas dari asam dan basa. Kolom diisi dengan pelarut kloroform sampai setengahnya, kemudian bubuk silika gel dimasukkan ke dalam kolom sedikit-sedikit sampai habis. Kolom dipenuhi dengan pelarut, kemudian kran dibuka sehingga pelarut keluar. Hal ini dilakukan berkali-kali sampai molekul silika gel menjadi padat. Untuk membantu mempercepat padatnya silika gel, kolom kromatografi dapat diketuk-ketuk dengan benda lunak.

### 3.2.1.3. Pemeriksaan Golongan Senyawa

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

#### Pengujian Adanya Triterpenoid dan Steroid

Sampel 50-100 mg dimasukkan dalam tabung reaksi. Dikocok dengan kloroform selama 15 menit. Larutan hasil ekstrak diambil 10 tetes, dan ditempatkan dalam plat tetes dibiarkan sampai kering, setelah itu 5 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat ditambahkan.

Adanya triterpenoid akan memberikan warna merah ungu sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.

#### Pengujian Adanya alkaloid

4 gr sampel digerus dalam lumpang porselen kemudian ditambahkan kloroform secukupnya sambil terus digerus sampai halus. Setelah halus ditambahkan 10 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  dalam kloroform. Saring untuk mendapatkan filtratnya masukkan dalam tabung reaksi. Ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan asam sulfat dengan konsentrasi 2 N sebanyak 10 tetes kemudian dikocok dengan teratur. Larutan bagian atas yang terdiri dari asam sulfat dan alkaloid dipipet dan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi. Ke dalam tabung reaksi ini dimasukkan pereaksi Mayer pada tabung satu dan yang lain ditambahkan pereaksi Wagner. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada penambahan pereaksi Mayer, endapan coklat pada penambahan pereaksi Wagner.

### Pengujian Adanya Saponin

2 gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi. Air ditambahkan sampai seluruh sampel terendam air, kemudian dididihkan selama 2 - 3 menit dan didinginkan. Setelah dingin dikocok kuat-kuat. Adanya buih yang stabil selama 30 menit setelah pengocokan menunjukkan adanya saponin.

### Pengujian Adanya Senyawa Fenol

Sampel ditambah dengan air suling kemudian dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan dipipet, masukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan larutan 1%  $\text{FeCl}_3$  ke dalam tabung reaksi tadi. Adanya Senyawa Fenol ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari hijau sampai hitam.

### 3.2.1.4. Pembuatan dan Pemeriksaan Ekstrak dari Bunga Artocarpus Communis terhadap Senyawa Golongan Triterpenoid

Ekstrak bunga dibuat dengan jalan sokletasi. Bahan yang telah ditumbuk halus dan dalam keadaan kering ( 600 gr ), dibungkus dalam kertas saring yang masing-masing beratnya sekitar 20 gram. Dasar soklet diberi glass wol agar bahan tidak terbawa oleh pelarut. Kemudian, alat soklet dipasang pada labu alas bulat yang berisi pelarut kloroform, serta dengan kondensor.

Pelarut dalam labu alas bulat dipanaskan, bila mendidih, uap pelarut akan ke kondensor, dan karena mendapat pendinginan pada alat pendingin, uap mengembun

turun ke alat soklet. Pelarut ini akhirnya melarutkan triterpenoid bersama dengan senyawa kimia lain dari bunga Kluweh. Bila ekstrak dalam soklet sudah memenuhi pipa cabang alat soklet, larutan ekstrak mengalir ke bawah untuk masuk kelabu bulat. Demikian seterusnya, pelarut menguap, mengembun, melarutkan ekstrak dan ekstrak turun ke labu bulat, berjalan secara kontinue. Bila dirasa telah cukup (indikasi: larutan dalam pipa cabang telah bening) ekstraksi dihentikan.

Ekstrak kloroform ini kemudian dipekatkan dengan jalan distilasi hingga volume seperlima volume asal.

Pemeriksaan ekstrak kloroform ini dilakukan dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang memberikan warna merah ungu dan warna biru.

#### 3.2.1.5. Isolasi dan Pemurnian Kandungan Kimia Ekstrak

Ekstrak kloroform ini dilakukan pemeriksaan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fasa diam silika gel G.60, sedangkan fasa geraknya menggunakan berbagai macam pelarut seperti : n-heksana, kloroform, etil asetat, metanol. Dengan pelarut n-heksana tidak memberikan pemisahan, dengan pelarut etil asetat memberikan hasil 2 noda, pelarut metanol tidak memberikan pemisahan yang baik, sedangkan dengan pelarut kloroform diperoleh 4 noda dengan harga Rf : 0,92; 0,76; 0,58; 0,25.

Ekstrak kloroform dipekatkan hingga pekat

sekali, kemudian dilakukan kromatografi kolom. Sebagai pengelusi digunakan pelarut kloroform.

Dari hasil kromatografi kolom, didapatkan 5 buah fraksi. Kemudian terhadap masing-masing fraksi dilakukan uji noda yang diadaptasikan dengan uji Liebermann-Burchard. Masing-masing fraksi ditotolkan pada KLT kemudian dielusi dengan pelarut kloroform, setelah kering disemprot dengan pereaksi LB dan dipanaskan dalam oven pada suhu  $85^{\circ} - 90^{\circ} \text{C}$  selama 15 menit. Ternyata hanya 1 fraksi ( fraksi ke tiga ) yang memberikan noda tunggal dengan warna ungu tunggal. Sedang fraksi yang lain tidak memberikan warna ungu.

Terhadap fraksi ke tiga ini, kemudian diuapkan pelarutnya, dan dikristalisasi dengan eter panas, kemudian didinginkan. Proses ini dilakukan 3 kali untuk memperoleh kristal yang murni.

Kristal yang diperoleh berwarna putih, berbentuk sisik dengan berat 200 mg.

### 3.2.1.6. Analisis Hasil Isolasi dengan Kromatografi Lapis Tipis serta Uji titik Leleh.

Kristal yang diperoleh diuji kemurniannya dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dua dimensi dengan pelarut eluent kloroform dan metanol dan dideteksi dengan uap Iodium ( $\text{I}_2$ ), diperoleh satu noda.

Sedangkan pengujian titik leleh dengan alat penentu



titik leleh "Thermoline" diperoleh titik leleh kristal  $99^{\circ} - 100^{\circ} \text{C}$ .

### 3.2.1.7. Analisis Spektroskopi Senyawa Hasil Isolasi

#### Spektrofotometer ultraviolet

Alat spektrofotometer Ultra Violet yang digunakan adalah "Hitachi", model 150-20, diperoleh panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum dalam pelarut kloroform adalah 239 nm.

#### Spektrofotometer Inframerah

Alat spektrofotometer Inframerah yang digunakan adalah "Hitachi", model 270-50 dengan menggunakan plat KBr. Spektrum inframerah senyawa hasil rekristalisasi dengan eter memberikan puncak-puncak pada bilangan gelombang :

( $\nu$ ) :  $2914 \text{ cm}^{-1}$  ;  $1728 \text{ cm}^{-1}$  ;  $1443 \text{ cm}^{-1}$  ;  $1371 \text{ cm}^{-1}$  ;  
 $1242 \text{ cm}^{-1}$  ;  $1092 \text{ cm}^{-1}$  ;  $1026 \text{ cm}^{-1}$  ;  $981 \text{ cm}^{-1}$  ;  $925 \text{ cm}^{-1}$  ;  
 $885 \text{ cm}^{-1}$  ;  $816 \text{ cm}^{-1}$  ;  $744 \text{ cm}^{-1}$  .

Dari data spektrum yang diperoleh, memperlihatkan puncak-puncak karakteristik antara lain :

$2914 \text{ cm}^{-1}$  : vibrasi ulur CH dari  $\text{CH}_3$  -,  $-\text{CH}_2$   
 $1728 \text{ cm}^{-1}$  : vibrasi ulur C=O (karbonil dari ester)  
 $1443-1371 \text{ cm}^{-1}$  : vibrasi tekuk C-H dari  $\text{CH}_3$  -,  $-\text{CH}_2$   
 $1242; 1026; 1092 \text{ cm}^{-1}$  : vibrasi ulur dari C-O ester  
 $981; 925; 885; 816;$   
 $744 \text{ cm}^{-1}$  : vibrasi tekuk  $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{C}=\text{C} \\ | \end{array}$

### Spektrofotometer NMR

Dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer NMR "Jeol-PMX 60" dengan pelarut  $\text{CDCl}_3$ , dengan standar TMS ( Trimetil Silan )

Sampel mengabsorpsi pada daerah :

$\delta$  2,05 ;  $\delta$  1,6 ;  $\delta$  1,25 ;  $\delta$  0,75 ;  $\delta$  0,31.

Dari data spektrum diatas memperlihatkan adanya atom-atom Hidrogen :

$\delta$  2,05 : sebuah metil group C=O

$\delta$  1,6 &  $\delta$  1,25 : dua buah metil vinil

$\delta$  0,75 &  $\delta$  0,31 : dua buah proton cincin siklopropana

### Spektroskopi massa

Dilakukan dengan menggunakan alat Spektrometer massa "Jeol JMS DX 303" , sampel dimasukkan dalam kapiler secara padat, memberikan puncak-puncak fragmentasi massa :

m/e (468); 453; 408; 393; 365; 339; 297; 286; 271; 217; 203