

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1 Lokasi Sampel

Dalam penelitian tidak menggunakan variabel apapun. Sampel tumbuhan *Solanum torvum Sw.* diambil dari beberapa daerah dataran tinggi yaitu Desa Jalimbing Tembalang Semarang, Desa Blotongan Salatiga, Desa Karangwuni Pringsurat Temanggung. Sampel tumbuhan yang digunakan untuk penelitian adalah buahnya yang sudah tua. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan November 1994 dan Februari 1995.

3.1.2 Bahan-bahan

Bahan kimia pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi adalah yang berkualitas teknis, sedangkan untuk analisis digunakan yang berkualitas p.a.

Bahan-bahan yang digunakan :

1. Amonium hidroksida p.a
2. Asam asetat anhidrid p.a
3. Asam sulfat pekat p.a
4. Aseton p.a
5. Aquades
6. Etil asetat teknis dan p. a
7. Ferri klorida p.a

8. Iodium p.a
9. Kalium Iodida p.a
10. Kertas saring
11. Kloroform teknis dan p.a
12. Metanol teknis dan p.a
13. Merkuri Klorida p.a
14. N-heksan teknis dan p.a
15. Lempeng KLT
16. Silika gel Kieselguhr G 60
17. Antimon (III) klorida p.a

3.1.3 Alat-alat

Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini adalah:

1. Botol 50 ml, 10 ml, 4 ml
2. Corong kaca
3. Dropperplate
4. Erlenmeyer 200 ml
5. Gelas ukur 10 ml, 25 ml
6. Gelas beaker 100 ml, 150 ml, 200 ml
7. Gelas arloji
8. Labu takar 100 ml
9. Lampu UV
10. Lumpang porselen
11. Mettler AT 200
12. Oven listrik model 630 F
13. Pengaduk

14. Pemanas listrik
15. Penjepit
16. Pembakar spirtus
17. Penangas air
18. Pipet tetes
19. Spatel
20. Seperangkat distilasi
21. Seperangkat evaporator "Buchi"
22. Seperangkat KCKT "Shimadzu"
23. Seperangkat kolom kromatografi
24. Seperangkat kromatografi lapis tipis
25. Seperangkat sokletasi
26. Termometer 110°C
27. Tabung reaksi
28. Sprayer botol

3.2 Metode Kerja

3.2.1 Identifikasi Tumbuhan dan Pembuatan Herbarium

Identifikasi tumbuhan dapat dilakukan dengan cara determinasi terhadap tumbuhan atau terhadap herbariumnya.

Sampel tumbuhan diambil dari Desa Jalimbing Tembalang. Kemudian spesimen herbarium tumbuhan sampel dibuat dengan menggunakan cara sasak yaitu :

sampel tumbuhan diambil bagian-bagiannya, daun, bunga, buah, batang dan akarnya yang bagus. Kemudian diatur sedemikian rupa di atas kertas koran atau

manila, sehingga bagian-bagian dari masing-masing terlihat jelas. Bagian atas dan bawah diberi sasak dan diikat, kemudian dijemur dibawah sinar matahari. Setelah kering, tumbuhan ini ditempelkan pada kertas herbarium dan diberi sampul transparan.

Penentuan jenis tumbuhan menggunakan buku kunci determinasi yang dilakukan di Laboratorium Biologi MIPA UNDIP pada bulan November 1994.

3.2.2 Pembuatan Pereaksi yang digunakan untuk identifikasi golongan senyawa

Pereaksi Liebermann-Burchard

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

Pereaksi Mayer

Terdiri dari 1,36 gram Merkuri Klorida yang dilarutkan dalam 60 ml aquadest dan 5 gram Kalium Iodida yang dilarutkan dalam 10 ml aquadest. Kedua larutan dicampur dan diencerkan sampai volume 100 ml.

Pereaksi Wagner

Terdiri dari 2,54 gram Iodium dan 2 gram Kalium Iodida yang dilarutkan dalam 10 ml aquadest. Kemudian diencerkan menjadi 100 ml, dan disaring.

Pereaksi Carr-Price

Terdiri dari Antimon (III) klorida yang dilarutkan dalam kloroform hingga jenuh.

Larutan FeCl_3 1%

Sebanyak 1 gram Feri Klorida dilarutkan dengan aquadest, kemudian diencerkan menjadi 100 ml.

3.2.3 Penggunaan Lempeng Kromatografi Lapis Tipis

Untuk menganalisis jumlah senyawa dalam ekstrak digunakan pelat kromatografi lapis tipis jadi, dengan penyerap silika gel. Penyerap ini dalam kromatografi lapis tipis berlaku sebagai fasa diam. Pelat KLT yang digunakan untuk analisis dengan ukuran panjang 10 cm dan lebar 3 cm.

Pelat Kromatografi Lapis Tipis sebelum digunakan untuk menganalisis, diaktifkan terlebih dahulu dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 30 menit.

3.2.4 Pembuatan kolom untuk kromatografi kolom

Kolom kaca untuk kromatografi kolom yang digunakan berdiameter 3 cm. Sebelum digunakan dicuci dengan air detergen, dibilas sampai bersih. Kemudian dicuci dengan aseton, dan dikeringkan. Terakhir dicuci dengan etil asetat yang akan digunakan untuk mengelusi kolom. Bubur silika dibuat dengan mencampur silika dengan etil asetat. Sebelum bubur ini dimasukkan ke dalam kolom, kolom diisi dengan etil asetat kira-kira $1/3$ dari panjang kolom,

hingga glasswol di ujung bawah tidak muncul gelembung-gelembung udara, kemudian dialasi dengan kertas saring. Kolom silika harus dijaga jangan sampai pelarutnya habis. Silika dalam kolom dibiarkan selama 24 jam, agar memadat. Setelah memadat, maka sampel siap dimasukkan ke dalam kolom untuk dielusi.

3.2.5 Skrining Fitokimia

Pemeriksaan golongan senyawa kimia yang dilakukan terhadap buah tumbuhan *Solanum torvum* adalah golongan alkaloid, triterpenoid, steroid, sapogenin steroid, fenol dan saponin.

Uji adanya alkaloid

Sampel sebanyak 4 gram digerus dalam lumpang porselin. Ke dalamnya ditambahkan kloroform, lalu ditambah dengan amonium hidroksida 10 ml. Kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah dengan asam sulfat 2N 10 tetes dan dikocok. Lapisan atas diambil dan ditetaskan pada dropperplate, lalu ditest dengan pereaksi Wagner dan Mayer. Uji ini positif bila memberikan endapan coklat terhadap pereaksi Wagner dan endapan putih pada pereaksi Mayer.

Uji adanya triterpenoid dan steroid

Sebanyak 100 gram sampel diekstrak dengan kloroform. Filtrat diambil dan ditetaskan pada dropperplate,

dibiarkan mengering. Ditetesi dengan asam asetat anhidrid 5 tetes dan asam sulfat pekat 1 tetes. Terbentuknya warna biru menunjukkan adanya steroid dan warna merah ungu menunjukkan adanya triterpenoid.

Uji adanya sapogenin steroid

Ekstrak kloroform dari uji steroid ditotolkan pada lempeng KLT dan dibiarkan kering di udara. Kemudian disemprot dengan pereaksi Carr-Price, dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C , warna ungu merah yang timbul menunjukkan adanya sapogenin steroid.

Pengujian adanya fenol

Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah aquadest dididihkan. Filtrat diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi lain ditambah larutan FeCl_3 1%. Perubahan warna dari hijau sampai dengan hitam menunjukkan adanya fenol.

Pengujian adanya saponin

Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah aquadest mendidih. Setelah dingin dikocok kuat-kuat. Adanya buih yang stabil selama 30 menit menunjukkan adanya saponin.

3.2.6 Perlakuan terhadap sampel.

Sampel buah dari *Solanum torvum Sw.* diiris tipis untuk memudahkan pengeringan. Dioven sampai kering. Dibuat serbuk dengan blender, dan dioven lagi.

Serbuk sampel sebanyak 35-40 gram dibungkus dengan kertas saring. Kemudian diekstraksi panas dengan soklet menggunakan pelarut n-heksan. Ekstraksi dihentikan bila pelarut pada siphon soklet sudah bening. Semua hasil sokletasi ditampung dan dipekatkan dengan evaporator. Krude hasil evaporasi dikumpulkan pada wadah tersendiri (fraksi n-heksan).

Sampel yang telah diekstraksi, kemudian diekstraksi lagi menggunakan pelarut kloroform. Ekstraksi dilakukan 3 x 24jam. Pelarutnya dikumpulkan, kemudian dievaporasi hingga pelarutnya habis. Krude hasil evaporasi merupakan krude fraksi kloroform. Sampel setelah diekstraksi dengan kloroform, diekstraksi lagi dengan pelarut metanol. Dengan cara yang sama diperoleh krude fraksi metanol.

Dari sampel kering sebanyak 1300 gram, diperoleh krude fraksi heksan berwarna hijau tua kekuningan sebanyak 10,495 gram, krude fraksi kloroform berwarna hijau tua kehitaman sebanyak 12,505 gram, krude fraksi metanol berwarna coklat tua sebanyak 203,686 gram.

3.2.7 Isolasi dan pemurnian kandungan ekstrak

Dari ketiga fraksi tersebut di atas selanjutnya dipilih fraksi metanol, dengan pertimbangan bahwa krude fraksi metanol paling banyak diantara ketiga fraksi tersebut, serta mengandung sapogenin steroid.

Pemeriksaan kandungan kimia pertama-tama dilakukan dengan kromatografi lapis tipis, untuk dapat diketahui banyaknya senyawa dalam hasil ekstraksi dan jenis fasa gerak yang digunakan.

Pemisahan krude fraksi metanol dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom. Fasa diam yang dipakai adalah silika gel G sebanyak 120 gram. Sampel yang berbentuk pasta sebanyak 3 gram dicampur dengan silika gel dimasukkan ke dalam kolom yang telah dipadatkan, dielusi dengan menggunakan pelarut etil asetat. Pada saat dielusi terlihat adanya "pita-pita" pada kolom, "pita" yang di bawah akan keluar paling awal. Hasil pemisahan ditampung pada botol yang berbeda. Dari masing-masing botol dilakukan kromatografi lapis tipis. Hasil KLT yang sama disatukan. Kemudian pelarutnya diuapkan hingga hanya 1/5 bagiannya, lalu dilakukan uji sapogenin steroid.

Dari hasil kromatografi kolom, diperoleh kristal berwarna kuning muda keras dan lengket. Untuk memurnikan kristal tersebut, dilakukan pencucian menggunakan pelarut n-heksan. Kemudian dimurnikan lagi dengan kloroform. Ditemukan kristal berwarna putih sebanyak

0,512 gram. Kemudian dilakukan uji Carr-Price (lihat lampiran 2).

3.2.8 Penentuan jenis senyawa

Untuk analisis senyawanya digunakan kromatografi cair tekanan tinggi dengan eluen n-heksan - aseton - metanol (18:1:1). Dengan cara membandingkan waktu retensi dengan literatur.

