

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Bahan dan Alat

##### 3.1.1. Lokasi bahan

Sampel tumbuhan berupa kulit batang diambil di desa Tlogomulyo, Kecamatan Pedurungan, Kotamadya Semarang, Jawa Tengah sedang determinasi sampel tumbuhan dilakukan di Lembaga Biologi Nasional Bogor.

##### 3.1.2. Bahan - bahan kimia

Bahan - bahan yang digunakan adalah :

1. Asam asetat anhidrid
2. Asam Sulfat pekat
3. Ammonium Hidroksida
4. Iodium
5. Metanol
6. Kloroform
7. Kalium Iodida
8. Etil asetat
9. Silika gel G 60
10. n-heksana
11. Ferri klorida
12. Merkuri (II) klorida
13. Aquades

### 3.1.3. Alat - alat yang digunakan

- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Tabung reaksi
- Corong
- Plat tetes
- Plat TLC
- Lumpang porselen
- 1 set peralatan evaporasi
- 1 set peralatan kromatografi kolom
- Oven listrik
- Penangas air
- Fisher John Melting Point
- Spektrofotometer IR jenis "Jasco FT/IR - 5300"
- Spektrofotometer UV jenis "Shimadzu UV-365"
- Spektrometer massa jenis Shimadzu

### 3.2. Metode Kerja

Batang tanaman diambil kulit batangnya, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan. Selanjutnya dihancurkan sampai menjadi serbuk.

#### 3.2.1 Di Laboratorium

Identifikasi dan isolasi senyawa golongan triterpenoid dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia MIPA Universitas Diponegoro.

Sedangkan analisis penentuan struktur senyawa hasil isolasi dilakukan di Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga dan Laboratorium Instrumen FMIPA UI Jakarta.

**3.2.1.1. Pembuatan pereaksi yang digunakan untuk identifikasi golongan senyawa**

**Pereaksi Liebermann - Burchard ( LB )**

Pereaksi Liebermann - Burchard terdiri dari asam asetat anhidrid dan asam sulfat pekat.

**Pereaksi Wagner**

Kalium Iodida ( KI ) sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 10 mL air suling. Iodium sebanyak 2,54 gram dimasukkan dalam larutan KI, kemudian campuran diencerkan hingga volumenya menjadi 100 mL. Setelah disaring pereaksi ini disimpan dalam botol gelap.

**Pereaksi Meyer**

Merkuri (II) klorida sebanyak 1,36 gram ditambahkan pada larutan 5 gram Kalium Iodida (KI) dalam 10 mL aquades. Campuran keduanya diencerkan menjadi 100 mL dengan aquades. Disimpan dalam botol warna gelap.

**Larutan Ferri Klorida 1%**

Dibuat dengan melarutkan 1 gram Ferri klorida dalam 100 mL aquades.

**Larutan  $H_2SO_4$  2 N**

Dibuat dengan melarutkan 5,5 mL  $H_2SO_4$  pekat menjadi 100 mL dengan aquades.

**3.2.1.2. Pembuatan dan pemeriksaan ekstrak dari kulit batang *Artocarpus communis* Forst terhadap senyawa golongan triterpenoid**

Kulit Batang tanaman ini diekstrak dengan jalan maserasi. Bahan yang telah ditumbuk halus dan dalam keadaan kering ( 800 gram ), direndam dalam perkolator yang bagian bawahnya telah dilapisi kapas selama 24 jam dengan pelarut n-heksana. Setelah 24 jam ekstrak dikeluarkan. Proses maserasi ini dilakukan sebanyak 4 kali.

Ekstrak n-heksana ini kemudian dipekatkan dengan jalan evaporasi hingga volume seperlima volume asal.

Selanjutnya dilakukan pemeriksaan terhadap golongan senyawa triterpenoid, steroid, alkaloid, saponin dan senyawa fenol.

**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, ditempatkan dalam plat tetes, dibiarkan sampai kering, setelah itu ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrid dan 1 tetes asam sulfat pekat.

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

Dari hasil analisis terhadap ekstrak n-heksana memberikan warna coklat kemerahan, menunjukkan hasil positif terhadap triterpenoid dan negatif terhadap steroid.

#### Pengujian Adanya Alkaloid

Sampel 4 gram digerus dalam lumpang porselein kemudian ditambahkan kloroform secukupnya sambil terus digerus sampai halus. Setelah halus ditambahkan 10 mL amonium hidroksida dalam kloroform. Saring untuk mendapatkan filtratnya, masukkan dalam tabung reaksi. Ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan Asam Sulfat 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 Meyer pada tabung satu dan yang lain ditambahkan pereaksi Wagner. Adanya alkaloid ini ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada penambahan pereaksi Meyer, endapan coklat pada penambahan pereaksi Wagner.

Dari hasil analisis terhadap ekstrak n-heksana untuk pengujian adanya alkaloid dengan pereaksi Meyer memberikan warna kuning muda, sedangkan pereaksi Wagner memberikan warna coklat. Keduanya menunjukkan hasil negatif terhadap senyawa alkaloid.

#### Pengujian Adanya Saponin

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

Analisis terhadap ekstrak n-heksana menunjukkan adanya buih stabil yang bertahan lebih dari 30 menit setelah pengocokan. Hal ini membuktikan hasil positif terhadap adanya saponin.

#### Pengujian Adanya Senyawa Fenol

Sampel ditambah air kemudian dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan dipipet, dimasukkan kedalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  1% ke dalam tabung reaksi tadi. Adanya senyawa fenol ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari hijau sampai hitam.

Analisis terhadap ekstrak n-heksana memberikan warna coklat muda, menunjukkan hasil negatif terhadap senyawa fenol.

#### 3.2.1.4. Pembuatan kromatografi kolom

Kolom kromatografi dengan diameter tertentu dicuci dengan detergen, dibilas dengan air bersih, dikeringkan dan diklem dengan posisi vertikal. Selanjutnya dicuci dengan pelarut n-heksana.

Sebagai adsorben digunakan silika gel G 60 yang diaktifkan pada suhu  $110^{\circ}\text{C}$  dalam oven kemudian didinginkan lalu dibuat bubur dengan pelarut n-heksana.

Bagian bawah kolom diberi kertas saring sesuai dengan diameter kolom dan diisi dengan sedikit pelarut n-heksana, kemudian bubur silika gel dimasukkan ke dalam kolom sedikit demi sedikit sampai habis. Kolom dipenuhi dengan pelarut, kran dibuka sehingga pelarut keluar. Hal ini dilakukan berkali - kali sampai molekul silika gel menjadi padat.

#### 3.2.1.5. Isolasi dan pemurnian kandungan kimia ekstrak

Ekstrak n-heksana ini dilakukan pemeriksaan dengan Kromatografi Lapis Tipis ( KLT ) dengan fasa diam silika gel G 60, sedangkan fasa geraknya menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, dan etil asetat.

Ekstrak n-heksana dipekatkan hingga pekat sekali, kemudian dilakukan kromatografi kolom. Sebagai pengelusian digunakan pelarut n-heksana pada awal pengelusian, dilanjutkan dengan menggunakan pelarut campuran ( N-heksana : Etil asetat ) berdasarkan kenaikan kepolaran dalam 100 mL campuran dimulai dari 5%, 10%, 20%, ..., 100% etil asetat.

Eluat hasil kromatografi ditampung dalam botol - botol berukuran 50 ml dan dilakukan analisis kualitatif dengan kromatografi lapis tipis. Eluat-eluat dengan noda sama dikumpulkan menjadi satu fraksi. Juga dilakukan

uji Liebermann-Burchard, yang sebagian besar fraksi memberikan hasil positif.

Dari hasil evaporasi terhadap fraksi-fraksi yang tertampung diperoleh bahwa fraksi ketiga menunjukkan kristal yang lebih banyak dibandingkan dengan fraksi-fraksi lain yang memberikan hasil positif dengan uji Liebermann-Burchard

Dilakukan rekristalisasi terhadap fraksi ketiga ini dengan menggunakan metanol. Proses rekristalisasi ini dilakukan berulang - ulang hingga diperoleh kristal yang murni.

#### 3.2.1.6. Analisis hasil isolasi dengan kromatografi lapis tipis serta uji titik leleh

Kristal yang diperoleh dilakukan analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis memberikan satu noda dengan berbagai pelarut yaitu n-heksana : etil asetat ( 95 : 5 ) n-heksan : etil asetat ( 5 : 1 ), n-heksan : kloroform ( 1 : 1 ) dan metanol.

Sedangkan pengujian titik leleh dengan menggunakan "Fisher John Melting Point".

#### 3.2.1.7. Analisis spektrofotometri senyawa hasil isolasi spektrofotometer ultra violet

Alat spektrofotometer ultra violet yang digunakan " Shimadzu UV - 365 " diperoleh panjang gelombang (  $\lambda$  ) maksimum dalam pelarut kloroform adalah 238 nm.

### **Spektrofotometer Infra Merah**

Alat spektrofotometer infra merah yang digunakan adalah " JASCO FT/IR - 5300 " dengan menggunakan pelet KBr. Spektrum senyawa hasil rekristalisasi dengan metanol memberikan puncak-puncak pada bila nagan gelombang ( $\bar{\nu}$ ):  $2937\text{ cm}^{-1}$ ;  $2872\text{ cm}^{-1}$ ;  $1736\text{ cm}^{-1}$ ;  $1638\text{ cm}^{-1}$ ;  $1458\text{ cm}^{-1}$ ;  $1375\text{ cm}^{-1}$ ;  $1246\text{ cm}^{-1}$ ;  $1095\text{ cm}^{-1}$ ;  $1041\text{ cm}^{-1}$ ;  $1030\text{ cm}^{-1}$ ;  $983\text{ cm}^{-1}$ ;  $920\text{ cm}^{-1}$ ;  $887\text{ cm}^{-1}$ ;  $819\text{ cm}^{-1}$ ;  $653\text{ cm}^{-1}$ ;  $609\text{ cm}^{-1}$ ;  $557\text{ cm}^{-1}$ ;  $462\text{ cm}^{-1}$ .

### **Spektrometer Massa**

Dilakukan dengan menggunakan alat spektrometer massa "Shimadzu", memberikan puncak-puncak fragmentasi massa : m/e : 468, 453, 408, 393, 365, 339, 297, 286, 271, 217, 203 189, 175 .