

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Sampel, Alat, Bahan

#### 3.1.1 Sampel

Sampel berupa ranting pohon bendo diperoleh di daerah Pedalangan, Banyumanik, Semarang.

#### 3.1.2 Alat-alat

Alat - alat yang digunakan adalah sebagai berikut :

- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Pipet tetes
- Tabung reaksi
- Corong gelas
- Pengaduk
- Spatel
- Botol gelas
- Plat tetes
- Pipa kapiler
- Lumpang porselin
- Blender
- Chamber
- Kertas saring Whatman

- Neraca analitik
- "Rotary evaporator"
- Peralatan pembuatan kromatografi lapis tipis (template tray, spreader, kaca 20 x 20 cm)
- Peralatan kromatografi kolom lengkap
- Oven
- Penangas
- Thermoline merk Fisher John
- Peralatan spektroskopi Ultra Violet jenis Shimadzu UV 365
- Peralatan spektroskopi Infra Red jenis JASCO FT/IR - 5300
- Peralatan Spektroskopi Massa Shimadzu

### 3.1.3 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah :

- Asam asetat anhidrid
- Asam sulfat pekat
- Amonium hidroksida
- Feriklorida
- Kalium bikromat
- Asam klorida
- Iodium
- Kalium Iodida
- Raksa(II)klorida
- Etanol teknis

- Etanol p.a
- Metanol p.a
- Kloroform p.a
- Etil asetat teknis
- n-heksana teknis
- Aseton teknis
- Aseton p.a
- Aquades
- Silika gel G 60 (70-230 mesh)
- Silika gel GF<sub>254</sub> 60 (70-230 mesh)

### 3.2 Metode Kerja

#### 3.2.1 Di Laboratorium

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang sedangkan untuk analisis identifikasi senyawa dilakukan di Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga dan Laboratorium Aviliasi FMIPA Universitas Indonesia.

##### 3.2.1.1 Persiapan sampel

Pada tahap ini ranting *Artocarpus elasticus* dikeringkan dan kemudian dihaluskan dengan blender sampai membentuk serbuk halus.

### 3.2.1.2 Pembuatan pereaksi

Pereaksi yang dibuat untuk identifikasi golongan senyawa adalah sbb :

#### - Pembuatan pereaksi Liebermann-Buchard

Terdiri dari asam asetat anhidrid dengan asam sulfat pekat yang disimpan secara terpisah.

#### - Pembuatan pereaksi Wagner

Dalam 10 ml aquadest dilarutkan Iodium sebanyak 2,54 gram dan Kalium Iodida sebanyak 2 gram, kemudian larutan ini diencerkan dengan aquadest sampai volume 100 ml. Setelah disaring disimpan dalam botol gelap.

#### - Pembuatan pereaksi Mayer

Raksa(II)klorida sebanyak 1,36 gram dalam erlenmeyer 100 ml dan pada erlenmeyer lainnya dilarutkan pula 5 gram kalium Iodida dalam aquadest 10 ml. Setelah itu larutan tersebut dicampurkan lalu diencerkan sampai volume 100 ml dengan aquadest. Pereaksi ini kemudian disimpan dalam botol gelap.

#### - Pembuatan $H_2SO_4$ 2 N

Diencerkan 5,5 ml  $H_2SO_4$  pekat dalam labu takar 100 ml dengan aquadest hingga tanda batas.

#### - Pembuatan larutan $FeCl_3$ 1 %

Ditimbang 1 gram  $FeCl_3$  dan dilarutkan dengan aquadest 100 ml.

### 3.2.1.3 Pembuatan kromatografi lapis tipis

Digunakan pelat kaca ukuran 20 x 20 cm, salah satu permukaannya dilapisi silika gel yang dilarutkan dalam air dengan perbandingan (1 : 1). Plat kaca yang sudah dilapisi diaktifkan dengan memanaskan dalam oven selama 1,5 jam pada suhu 110°C.

### 3.2.1.4 Pembuatan kromatografi kolom

Kolom kromatografi dengan diameter tertentu dicuci untuk menghilangkan lemak apabila ada pada kolom dengan merendam dalam kalium bikromat yang dicampur dengan asam sulfat pekat beberapa jam, lalu dicuci bersih dengan detergen dan air suling dan kemudian dikeringkan. Sebagai adsorben digunakan silika gel G 60 yang diaktifkan pada suhu 110°C dalam oven lalu didinginkan dengan mendingkannya pada udara dan selanjutnya dibuat bubur dengan pelarut n-heksana. Kolom kromatografi yang telah bebas lemak diklem pada posisi vertikal, bagian bawah kolom dilapisi kapas atau glasswool. Kolom diisi dengan pelarut sampai setengah, bubur silika gel dimasukkan ke dalam kolom sedikit-sedikit sampai habis. Kolom dipenuhi dengan pelarut lalu kran dibuka sehingga pelarut keluar. Hal ini dilakukan berulang-ulang sampai silika gel menjadi padat.

### 3.2.1.5 Pemeriksaan golongan senyawa

#### a. Pengujian adanya triterpenoid dan steroid

Sampel 50-100 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kocok dengan kloroform selama 15 menit. Larutan hasil ekstrak diambil 10 tetes dan ditempatkan pada plat tetes dibiarkan sampai kering. Setelah itu 5 tetes asam asetat anhidrid dan 1 tetes asam sulfat pekat ditambahkan. Adanya triterpenoid ditandai perubahan warna merah ungu, sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.

#### b. Pengujian alkaloid

Sampel mula-mula dihaluskan ditambahkan kloroform secukupnya sambil tetap dihaluskan. Selanjutnya ditambahkan amonium hidroksida dalam kloroform dan dipisahkan dalam tabung reaksi sambil disaring. Hasil saringan yang ada dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan dengan asam sulfat 2N sebanyak 10 tetes dan kemudian dikocok. Cairan bagian atas yang merupakan asam sulfat dan alkaloid diambil dengan pipet dimasukan kedalam 2 tabung reaksi yang lain. Ke dalam kedua tabung reaksi tersebut ditambahkan pereaksi Mayer dan Wagner. Hasil positif jika diperoleh endapan, dengan pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih dan pereaksi Wagner menghasilkan endapan coklat.

**c. Pengujian saponin**

Dua gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Air ditambahkan sampai seluruhnya terendam air lalu dididihkan 2-3 menit dan dinginkan, setelah dingin kocok kuat-kuat. Adanya saponin ditunjukkan busa yang stabil selama 30 menit.

**d. Pengujian fenol**

Sampel ditambah aquadest kemudian dipanaskan hingga mendidih, air rebusan dipipet dimasukan kedalam tabung reaksi. Tambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1% ke dalam tabung reaksi tersebut. Adanya senyawa fenol ditandai adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam.

**3.2.1.6 Pembuatan dan pemeriksaan ekstrak dari *Artocarpus elasticus***

Sampel yang sudah berbentuk serbuk halus diperlakukan proses maserasi yaitu dengan cara direndam dalam pelarut organik (n-heksana) selama 3 x 24 jam. Hasil ekstrak (berupa larutan berwarna kuning) ditampung dalam botol dan kemudian diuapkan dengan menggunakan "rotary evaporator" sampai volumenya seperlima dari volume awal. Kemudian diuji dengan menggunakan reagen Liebermann-Buchard untuk mengetahui adanya golongan senyawa triterpenoid dan steroid.

Ekstrak yang telah diperoleh dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan berbagai eluen yaitu n-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol. Pemilihan eluen ini diharapkan telah mewakili tingkat-tingkat kepolaran. Untuk mengetahui adanya bercak noda digunakan lampu Ultra violet, uap Iodium ( $I_2$ ) atau dengan cara disemprot dengan pereaksi Liebermann-Buchard. Pada uji kromatografi lapis tipis ini dapat digunakan kombinasi eluen n-heksana : etil asetat, atau n-heksana : kloroform dengan perbandingan tertentu, kemudian dipilih mana yang memberikan pemisahan yang baik.

#### 3.2.1.7 Isolasi dan Pemurnian Kandungan Senyawa dari Ekstrak *Artocarpus elasticus*

Ekstrak yang diperoleh berupa cairan kental berwarna kuning tua dan padatan. Kemudian padatan dipisahkan dari larutannya. Dan selanjutnya yang dianalisis lebih lanjut adalah fraksi cairan.

Pemisahan komponen dari fraksi cairan dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom. Sampel sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam kromatografi kolom dengan menggunakan fasa diam silika gel G 60 dan proses elusi digunakan metode elusi gradien. Sampel yang telah dimasukkan dielusi dahulu dengan n-heksana sehingga diperoleh fraksi berupa pita-pita dan kemudian diturunkan. Setelah itu dilakukan elusi dengan



menaikkan kepolarannya dengan menambahkan etil asetat 1% dan fraksi yang keluar ditampung. Demikian seterusnya kepolaran dinaikkan 2%,3%,4% dan seterusnya.

Dari seluruh fraksi yang diperoleh dilakukan uji kromografi lapis tipis (KLT). Yang menghasilkan noda dengan jumlah yang sama dan harga Rf sama dikumpulkan dalam satu botol sehingga mewakili satu fraksi dan kemudian pelarutnya diuapkan dengan menggunakan "rotary evaporator" sehingga diperoleh fraksi yang kental.

Langkah selanjutnya adalah melakukan uji Liebermann-Buchard untuk mengetahui fraksi mana yang positif mengandung triterpenoid.

Salah satu dari fraksi yang positif terhadap triterpenoid direkrystalisasi dengan menggunakan metanol panas sehingga diperoleh kristal putih kekuningan. Rekrystalisasi dilakukan 3 kali dan selanjutnya kembali dilakukan uji KLT.

Untuk mendapatkan senyawa murni dilakukan juga metode kromatografi lapis tipis preparatif dengan fasa diam berupa silika gel G 60 pada plat kaca 20 x 20 cm dengan eluen n-heksana : etil asetat (13:1) sehingga diperoleh pita-pita. Selanjutnya pita-pita dikerok, diekstraksi dengan kloroform dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditampung dalam botol dan diuapkan. Kemudian dilakukan rekrystalisasi 3 kali menggunakan metanol panas. Kristal yang diperoleh dipisahkan dan diuji dengan kromatografi lapis tipis dan juga diuji dengan pereaksi

Liebermann-Buchard.

### 3.1.2.8 Analisis hasil

#### - Uji kelarutan

Dilakukan uji kelarutan terhadap kristal yang diperoleh dan hasilnya adalah kristal larut sebagian dalam n-heksana, larut baik dalam kloroform, larut dalam aseton dan tidak larut dalam etanol dan metanol.

#### - Analisis kemurnian

Dilakukan uji titik leleh menggunakan "melting point Fisher John" diperoleh titik leleh 80-82°C.

#### - Analisis spektra dengan spektrofotometri Ultra Violet

Dilakukan analisis dengan spektrofotometer Ultra violet jenis Shimadzu UV-365 menghasilkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 240 nm yang menunjukkan transisi elektron dari  $n \rightarrow \pi^*$ .

#### - Analisis spektra dengan spektrofotometri Infra merah

Dilakukan analisis spektra dari spektrofotometer Infra merah jenis JASCO FT/IR -5300 dengan menggunakan pelet Kalium bromida (KBr) dihasilkan puncak-puncak pada bilangan gelombang ( $\tilde{\nu}$ ) sebagai berikut: 3431  $\text{cm}^{-1}$ , 2920  $\text{cm}^{-1}$ , 2852  $\text{cm}^{-1}$ , 2361  $\text{cm}^{-1}$ , 1736  $\text{cm}^{-1}$ , 1653  $\text{cm}^{-1}$ , 1458  $\text{cm}^{-1}$ , 1375  $\text{cm}^{-1}$ , 1246  $\text{cm}^{-1}$ , 1041  $\text{cm}^{-1}$ , 984  $\text{cm}^{-1}$ , 876  $\text{cm}^{-1}$ , 738  $\text{cm}^{-1}$ , 715  $\text{cm}^{-1}$ , 669  $\text{cm}^{-1}$ , 600  $\text{cm}^{-1}$ , 469  $\text{cm}^{-1}$ .

- Analisis spektra dari Spektroskopi Massa

Dilakukan analisis Spektroskopi Massa jenis Shimadzu menghasilkan puncak-puncak fragmentasi pada m/e 468 (0,4%), 453 (0,2%), 410 (4%), 408 (1%), 394 (1,7%), 393 (0,6%), 365 (0,3%), 339 (0,3%), 297 (0,1%), 286 (0,3%), 271 (0,2%), 203 (5,2%).

