

BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Sampel

Sampel berupa kulit batang *Artocarpus communis* Forst (kluweh) yang diambil dari Desa Tlogomulyo, Pedurungan, Semarang, Jawa Tengah. Determinasi sampel dilakukan di lembaga Biologi Nasional Bogor.

3.1.2 Bahan-bahan kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Kloroform p.a.
2. Kloroform teknis
3. n-heksana p.a.
4. n-heksana teknis
5. Etil asetat p.a.
6. Etil asetat teknis
7. Metanol p.a.
8. Metilen Klorida p.a.
9. Anhidrida asam asetat
10. Asam sulfat pekat
11. Benzena p.a.
12. Aseton teknis
13. Silika Gel 60 G

14. Silika Gel 60 GF₂₅₄

16. Akuades

3.1.3 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan :

1. Perkolator
2. Erlenmeyer
3. Gelas ukur
4. Pengaduk
5. Spatula
6. Timbangan
7. Botol gelas
8. Blender
9. Oven listrik
10. Plat tetes
11. Pipet
12. Corong gelas
13. Satu set rotary evaporator
14. Fisher john melting point
15. TLC plates aluminium sheets, silika gel 60 GF₂₅₄
16. Lampu UV
17. Satu set kromatografi kolom vakum
18. Satu set alat pembuat kromatografi lapis tipis preparatif Desaga
19. Spektrofotometer IR Jasco FT/IR-5300
20. Spektrofotometer massa Shimadzu
21. Spektrofotometer UV Shimadzu

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Persiapan sampel

Kulit batang tanaman *Artocarpus coomunis* Forst dipotong kecil-kecil dan dibiarkan mengering di udara terbuka. Kemudian ditumbuk sampai menjadi serbuk.

3.2.2 Pembuatan kromatografi lapis tipis preparatif

Pelat kaca berukuran 20 x 20 cm dicuci dengan aseton. Salah satu permukaannya dilapisi dengan bubuk silika gel 60 GF₂₅₄ dalam air (1 : 2) dengan peralatan Desaga (tebal lapisan dibuat 1,25 mm). Lapisan dibiarkan pada suhu kamar selama tiga jam. Sebelum dipakai diaktifkan dahulu dengan memanaskannya dalam oven pada suhu 110 °C selama 1, 5 jam.

3.2.3 Pembuatan kromatografi kolom vakum

Kolom kromatografi beserta tabung vakumnya dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan pelarut yang akan digunakan. Alat dipasang dan dihubungkan dengan vakum kondensor.

Fasa diam diaktifkan dalam oven pada suhu 150°C selama tiga jam. Setelah dingin ditempatkan dalam kolom dan vakum kondensor dihidupkan sampai fasa diam memadat. Kemudian dielusi dengan fasa gerak yang akan digunakan.

3.2.4 Ekstraksi sampel

Ekstraksi dilakukan dengan cara merendam sampel (800 gram) dalam perkolator selama 24 jam dengan pelarut

n-heksana. Ekstraksi dengan n-heksana dilakukan 4 x 24 jam.

Residu ekstrak n-heksana diekstraksi lagi dengan kloroform sebanyak 4 x 24 jam. Hasil ekstrak kloroform dipekatkan hingga menjadi 6,2 gram. Selanjutnya dikromatografi lapis tipis dan dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum dan kromatografi lapis tipis preparatif.

3.2.5 Pemisahan dengan kromatografi

Sebelum pemisahan dengan kromatografi kolom vakum (KKV) dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT). Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui jumlah komponen yang terkandung dalam sampel dan kualitas pemisahan suatu pelarut. Sebagai fasa diam digunakan silika gel 60 GF254 dan fasa geraknya dipakai beberapa eluen seperti : n-heksana, kloroform, etil asetat, metilen klorida, metanol dan campuran di antara eluen-eluen tersebut.

Sampel ditotolkan dengan pipa kapiler dalam lempeng kromatografi lapis tipis kemudian dielusi dengan fasa geraknya (eluen). Sebagai penampak bercak digunakan lampu UV.

3.2.5.1 Kromatografi kolom vakum

Sebanyak 3,2 gram *gummy mass* dilarutkan dalam sedikit kloroform dan ditambah silika gel 60 GF254 sampai semua sampel terserap. Kemudian dimasukkan ke KKV dan dielusi dengan campuran kloroform-etil asetat berdasarkan

kenaikan kepolaran (10%, 20%,...,100% etil asetat dalam kloroform). Setiap kali elusi digunakan 50 ml eluen yang ditambahkan dari atas kolom dan dihisap dengan vakum kondensor. Eluat yang dihasilkan ditampung dalam botol, masing-masing dikromatografi lapis tipis. Eluat dengan harga R_f yang sama dikumpulkan menjadi satu fraksi, kemudian dipekatkan. Fraksi II dan III dari KKV ini diuji KLT, kemudian fraksi III dipisahkan lagi dengan KKV.

Kromatografi kolom vakum yang kedua digunakan untuk memisahkan fraksi III dari KKV yang pertama. Fraksi III sebanyak 1,2 gram dielusi dengan campuran n-heksana-etil asetat berdasarkan kenaikan kepolaran memakai fasa diam silika gel 60 G. Dari pemisahan ini fraksi 3 diuji KLT, kemudian untuk memisahkannya dilakukan KLT preparatif.

3.2.5.2 Kromatografi lapis tipis preparatif

Fraksi 3 dari fraksi III diatas (45 miligram) dilarutkan dalam kloroform kemudian ditotolkan pada lempeng KLT preparatif yang telah diaktifkan. Sebagai fasa diam digunakan silika gel 60 GF²⁵⁴ dan kloroform sebagai eluennya. Bercak A dan B dikerok dan dilarutkan dengan kloroform. Untuk mendapatkan senyawanya, filtrat diambil dengan penyaringan vakum. Filtrat diuapkan pada suhu kamar, sehingga diperoleh suatu padatan.

3.2.6 Pemurnian

Senyawa dari fraksi II hasil KKV pertama dicuci dengan n-heksana berulang kali untuk melarutkan cairan

yang bercampur dengan padatan. Sehingga padatan yang berwarna putih terpisah dengan larutan yang berwarna jingga. Padatan ini (kemudian disebut dengan senyawa I) dianalisis lebih lanjut.

Padatan yang diperoleh dari bercak A dan B (disebut dengan senyawa II dan III) masing-masing dilarutkan dalam metanol panas dan disaring, kemudian dianalisis lebih lanjut.

3.2.7 Analisis senyawa hasil isolasi

3.2.7.1 Uji Lieberman-Burchard

Senyawa hasil isolasi ditempatkan dalam plat tetes, kemudian ditambahkan anhidrida asam asetat dan asam sulfat pekat.

3.2.7.2 Uji titik leleh

Sejumlah kecil sampel ditempatkan pada plat kaca Fisher John Melting Point. Kemudian diamati sampai senyawa yang terlihat, menjadi cairan.

3.2.7.3 Uji kromatografi lapis tipis

Senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam kloroform kemudian ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis berfasa diam silika gel 60 GF₂₅₄ dengan eluen kloroform, n-heksana, etil asetat dan campuran di antaranya. Sebagai penampak bercak digunakan lampu UV.

3.2.7.4 Uji kelarutan

Senyawa yang diperoleh dilarutkan dalam berbagai pelarut yang diharapkan dapat mewakili tingkat-tingkat kepolaran seperti : n-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol.

3.2.7.5 Analisis Spektra Massa (MS)

Sebanyak satu miligram senyawa hasil isolasi dimasukkan dalam spektrofotometer massa, spektra yang dihasilkan memberikan informasi masa per muatan (m/z) versus kelimpahan relatif dari masing-masing pecahan.

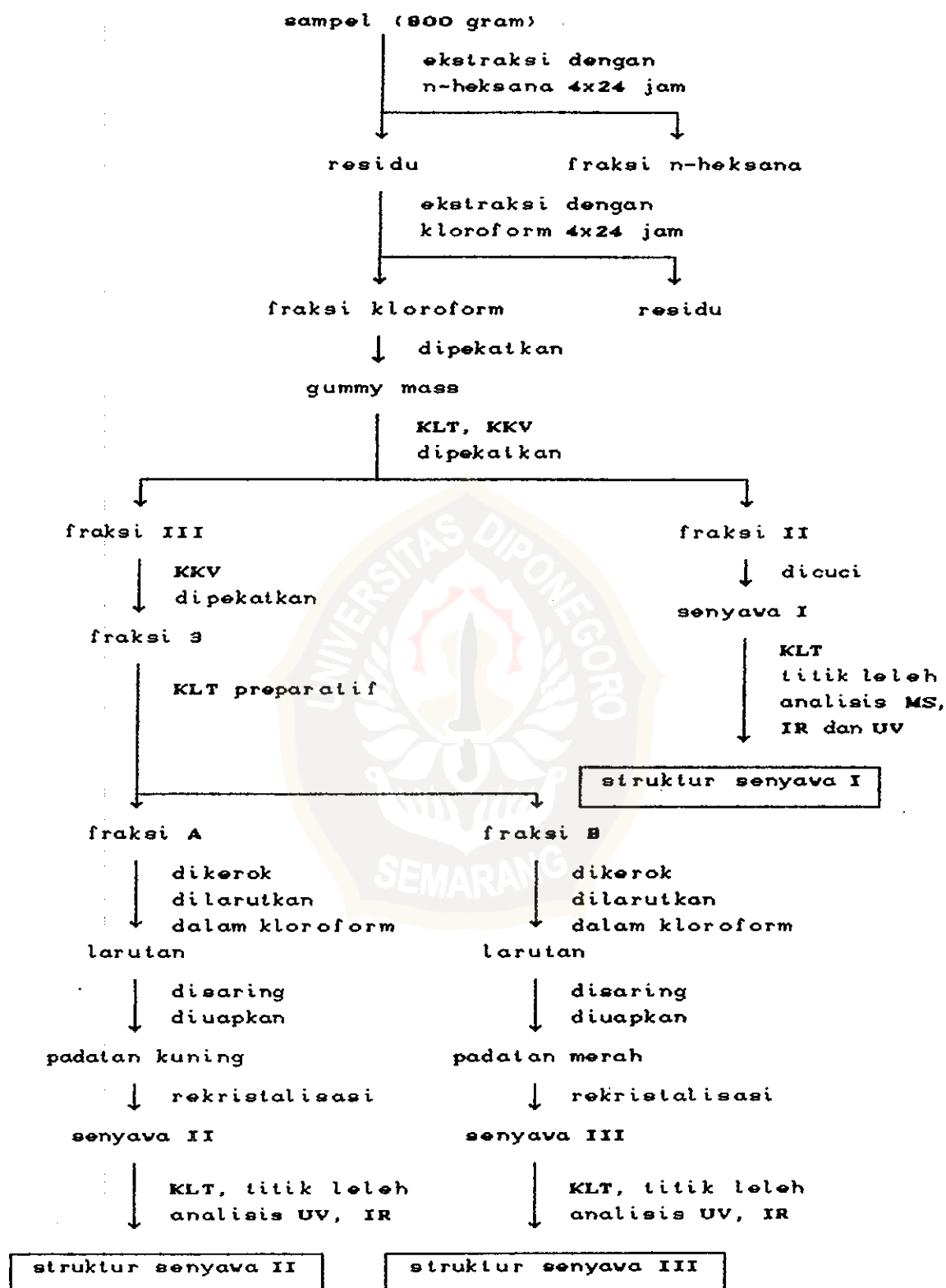
3.2.7.6 Analisis Spektra Infra Merah (IR)

Sebanyak satu miligram senyawa hasil isolasi dibuat pelet dengan seratus mili gram kalium bromida dan dimasukkan dalam Spektrofotometer IR. Spektra yang dihasilkan menunjukkan serapan gugus fungsi tertentu.

3.2.7.7 Analisis Spektra Ultra Violet (UV)

Sejumlah cuplikan dilarutkan dalam kloroform kemudian dimasukkan dalam kuvet dan disinari dengan sinar UV. Spektra yang dihasilkan menunjukkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh senyawa contoh.

Berikut disajikan skema kerja yang telah dilakukan :



Gambar III.1 : Skema isolasi senyawa ekstrak kloroform