

BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Sampel Alat dan Bahan

3.1.1 Sampel

Sampel berupa ranting pohon *A. elasticus* (bendo) yang diambil di desa Pedalangan, kecamatan Banyumanik, Semarang Selatan.

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut:

- n-heksan teknis dan p.a.
- Kloroform teknis dan p.a.
- Etil asetat teknis dan p.a.
- Metanol p.a.
- Benzena p.a.
- Anhidrat asam asetat p.a.
- Asam sulfat p.a.
- Iodium p.a.
- Kalium iodida p.a.
- Raksa (II) klorida p.a.
- Besi (III) klorida 1%
- Asam klorida pekat p.a.
- Silika gel 60 G
- Plat KLT
- Aquades
- Kertas saring

3.1.3 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah sebagai berikut :

- Perkolator
- Gelas beaker
- Gelas ukur
- Erlenmeyer
- Pipet ukur
- Pipet tetes
- Corong gelas
- Pengaduk
- Spatula
- Plat tetes
- Tabung reaksi
- Botol gelas
- Pipa kapiler
- Lampu ultra violet
- Plat KLT
- Satu set kromatografi kolom vakum
- Satu set kromatografi kolom
- Satu set Rotary evaporator
- Timbangan
- Oven
- Penangas
- Blender
- Fisher John Melting Point
- Spektrofotometer ultra violet Shimadzu
- Spektrofotometer JASCO FT/IR-5300

- Spektrofotometer massa

3.2 Metode Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Tugas Akhir Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA UNDIP Semarang, sedangkan analisa identifikasi senyawa dilakukan di Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga.

3.2.1 Persiapan sampel

Ranting *A. elasticus* dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian dipotong-potong dan dihaluskan dengan blender sampai membentuk serbuk halus.

3.2.2 Pembuatan pereaksi

Pereaksi yang dibuat untuk analisa golongan senyawa adalah sebagai berikut:

3.2.2.1 Pembuatan pereaksi Lieberman-Burchard

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

3.2.2.2 Pembuatan pereaksi Wagner

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

3.2.2.3 Pembuatan pereaksi Mayer

Raksa (II) klorida sebanyak 1,36 gram dilarutkan dalam 10 ml aquades (tabung 1) dan KI sebanyak 5 gram

dilarutkan dalam 10 ml aquades (tabung 2). Kemudian larutan tersebut dicampurkan dan diencerkan dengan aquades sampai volume 100 ml. Pereaksi ini kemudian disimpan dalam botol gelap.

3.2.2.4 Pembuatan H_2SO_4 2N

Asam sulfat pekat sebanyak 5,5 ml diencerkan dengan aquades dalam labu takar 100 ml.

3.2.2.5 Pembuatan larutan $FeCl_3$ 1%

$FeCl_3$ sebanyak 1 gr dilarutkan dengan aquades dalam labu takar 100 ml.

3.2.3 Pembuatan kromatografi kolom vakum

Kolom kromatografi vakum dicuci dengan detergen, kemudian dibilas dengan aquades, dikeringkan dan dibilas dengan pelarut n-heksan. Alat dipasang dan dihubungkan dengan vakum kondensor. Sebagai adsorben digunakan silika gel 60 G yang telah diaktifkan pada suhu 150° selama tiga jam di dalam oven. Setelah dingin, adsorben dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dipadatkan dengan mengurangi tekanan di dalam kolom. Adsorben dielusi dengan n-heksan sebanyak 100 ml, kemudian dipadatkan lagi dengan cara yang sama. Hal ini diulang beberapa kali sampai adsorben menjadi padat.

3.2.4 Pembuatan kromatografi kolom

Kolom kromatografi dicuci dengan detergen dan dibilas dengan aquades, dikeringkan dan dibilas lagi menggunakan

n-heksan. Kemudian alat dipasang.

Adsorben, silika gel 60 G diaktifkan dalam oven pada suhu 150°C selama tiga jam. Setelah dingin, silika gel 60 G dibuat menjadi bubuk, menggunakan pelarut n-heksan. Bubur silika dimasukkan ke dalam kolom yang telah diisi dengan n-heksan. Adsorben dielusi dengan n-heksan sampai padat.

3.2.5 Analisa skrining fitokimia ranting *A.elasticus* Reinw

Dilakukan analisa skrining fitokimia terhadap ranting *A. elasticus* Reinw, meliputi analisa golongan senyawa triterpenoid, alkaloid, saponin dan fenol.

3.2.5.1 Pengujian senyawa triterpenoid dan steroid

Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan kloroform sebanyak 5 ml. Selanjutnya dipanaskan sebentar diatas penangas air sambil dikocok-kocok, kemudian didinginkan. Filtrat dipipet dan ditempatkan dalam plat tetes sebanyak 10 tetes serta dibiarkan hingga kering. Ditambahkan anhidrat asetat sebanyak 5 tetes dan asam sulfat pekat 1 tetes. Terbentuknya warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan terbentuknya warna biru menunjukkan adanya steroid.

3.2.5.2 Pengujian senyawa saponin

Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan kedalamnya 10 ml air dan dididihkan kira-kira 2-3 menit kemudian didinginkan. Kocok

kuat-kuat selama 10 menit. Timbulnya busa stabil selama 10 menit menunjukkan adanya saponin. Dari pemeriksaan yang dilakukan menunjukkan tidak terbentuk busa stabil selama 10 menit.

3.2.5.3 Pengujian senyawa fenol

Sampel ditambah dengan air dan dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan dipipet, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan larutan besi (III) klorida 1% kedalamnya. Adanya senyawa fenol ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari hijau sampai hitam.

3.2.5.3 Pengujian senyawa alkaloid

Sampel sebanyak 4 gram dihaluskan dalam lumpang porselin, kemudian ditambahkan kloroform secukupnya sambil terus dihaluskan. Selanjutnya asam sulfat 2N sebanyak 10 tetes ditambahkan, dikocok dengan teratur dan ditambahkan NH_4OH kedalamnya. Cairan bagian atas (asam sulfat dan alkaloid) dipipet, lalu dimasukkan ke dalam dua buah tabung reaksi. Tabung reaksi pertama berisi pereaksi Mayer dan tabung reaksi kedua berisi pereaksi Wagner. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih (dengan pereaksi Mayer) dan endapan coklat (dengan pereaksi Wagner).

3.2.6 Ekstraksi sampel

Sampel yang berbentuk serbuk halus sebanyak 1 kg diekstrak dengan cara perendaman dalam perkolator menggunakan pelarut n-heksan selama 4 x 24 jam. Residunya

direndam lagi dalam pelarut kloroform selama 4 x 24 jam. Ekstrak kloroform dipisahkan dalam pemekat vakum berputar (*rotary evaporator*) sampai volumenya menjadi seperlima volume awal.

3.2.7 Analisa pendahuluan

Filtrat yang pekat tersebut dianalisa lebih lanjut menggunakan KLT dengan berbagai eluen, yaitu n-heksan, kloroform, etil asetat, metanol dan campuran dua pelarut. Pemilihan eluen diharapkan telah mewakili tingkat-tingkat kepolaran. Untuk mengetahui adanya bercak noda digunakan lampu ultra violet. Dari uji KLT ini kemudian dapat dipilih yang memberikan pemisahan noda yang baik dan banyak.

3.2.8 Pemisahan dengan kromatografi

Sebanyak 5 gram *gummy mass* dilarutkan dalam sedikit n-heksan dan ditambahkan silika gel 60 G sampai semua sampel terserap. Kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dielusi menggunakan campuran pelarut n-heksan-etil asetat berdasarkan kenaikan kepolaran dengan menambahkan etil asetat 1%, 2%, 3%, dan seterusnya sampai 100%. Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dalam botol-botol kaca. Dari seluruh fraksi yang diperoleh dilakukan uji KLT, yang menghasilkan noda sama digabung menjadi satu, kemudian pelarutnya diuapkan dalam *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental yang selanjutnya dipindahkan ke dalam botol-botol kaca. Fraksi II dan fraksi VII

dianalisa KLT, kemudian fraksi VII dipisahkan lagi dengan kromatografi kolom (KK).

Fraksi VII sebanyak 1 gram dilarutkan dalam sedikit n-heksan dan ditambah silika gel 60 G sampai semua sampel terserap. Kemudian dimasukkan ke KK dan dielusi dengan campuran n-heksan-etil asetat berdasarkan kenaikan kepolaran (1%, 2%, 3%,...,100% etil asetat dalam n-heksan). Dari pemisahan ini fraksi 1 dianalisa KLT.

3.2.9 Pemurnian

Terhadap fraksi II diperlakukan proses pemurnian dengan cara rekristalisasi menggunakan metanol sehingga diperoleh kristal putih (senyawa I). Rekristalisasi diulangi beberapa kali. Untuk menguji kemurniannya, maka dilakukan uji KLT.

Terhadap fraksi 1 dilakukan pemurnian dengan cara rekristalisasi menggunakan metanol, diperoleh kristal putih (senyawa II). Rekristalisasi diulangi beberapa kali. Untuk menguji kemurniannya maka dilakukan uji KLT.

3.2.10 Analisa senyawa hasil isolasi

3.2.10.1 Analisa Lieberman-Burchard

Dilakukan analisa Lieberman-Burchard terhadap senyawa I dan II. Sejumlah senyawa hasil isolasi ditempatkan dalam plat tetes. Sedikit kloroform ditambahkan dan dibiarkan sampai kering, kemudian ditambahkan anhidrida asetat dan asam sulfat pekat.

3.2.10.2 Analisa kelarutan

Dilakukan analisa kelarutan terhadap senyawa I dan II menggunakan berbagai pelarut yang diharapkan dapat mewakili tingkat-tingkat kepolaran seperti : n-heksan, kloroform dan metanol.

3.2.10.2 Analisa titik leleh

Dilakukan analisa titik leleh terhadap senyawa I dan II dengan menggunakan alat *Fisher John Melting Point*. Sejumlah kecil senyawa hasil isolasi ditempatkan pada plat kaca alat, kemudian diamati sampai senyawa mencair.

3.2.10.3 Analisa spektrum ultra violet

Dilakukan analisa dengan menggunakan spektrofotometer ultra violet terhadap senyawa I dan II. Sejumlah kecil senyawa dilarutkan dalam kloroform kemudian dimasukkan kedalam kuvet dan disinari dengan sinar UV. Spektrum yang dihasilkan menunjukkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh senyawa.

3.2.10.4 Analisa spektrum infra merah

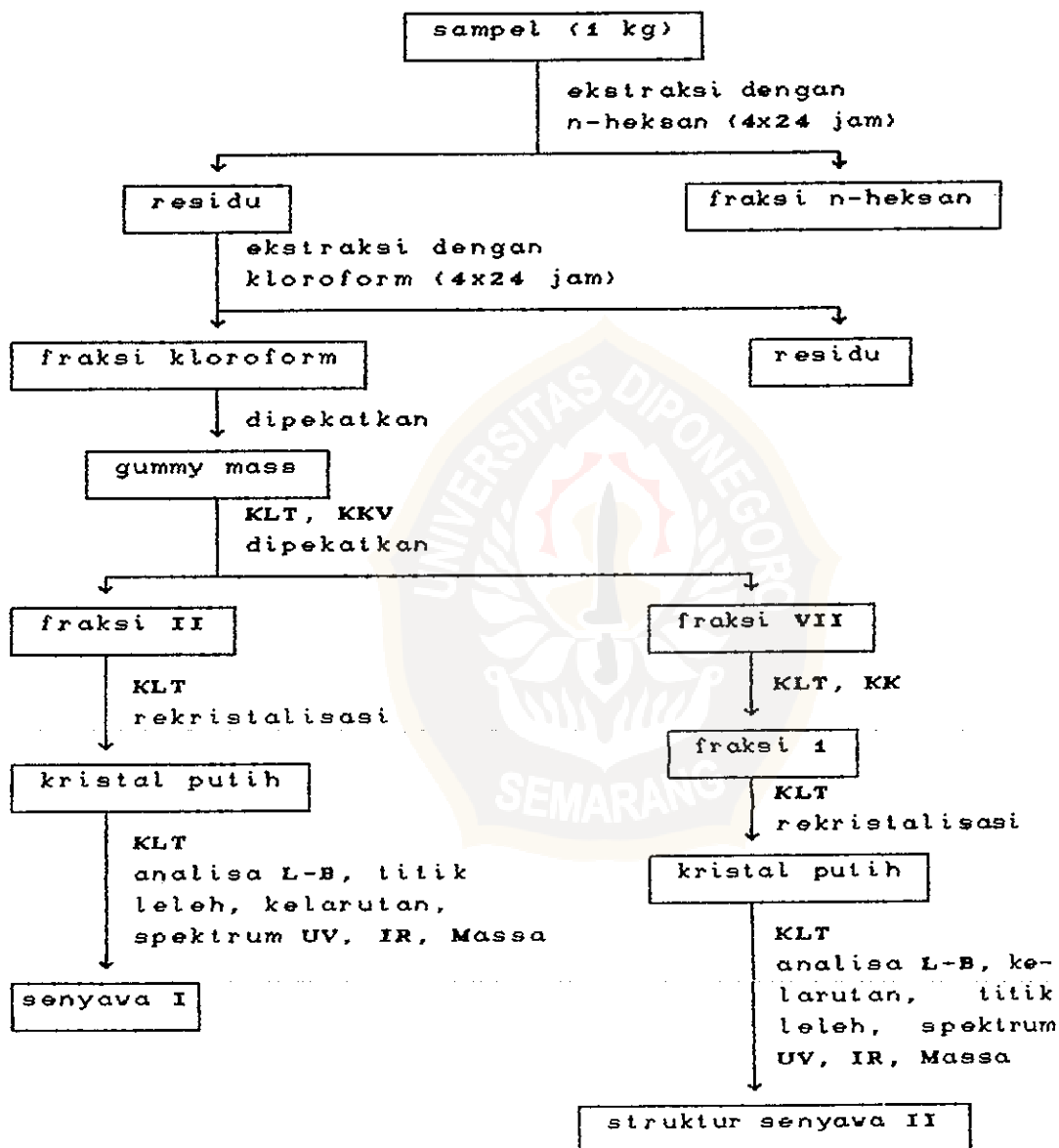
Dilakukan analisa dengan menggunakan spektrofotometer infra merah terhadap senyawa I dan II dengan menggunakan pelet KBr. Sampel sebanyak satu miligram dibuat menjadi pelet dengan 100 mg kalium bromida kemudian dimasukkan ke dalam alat.

3.2.10.5 Analisa spektrum massa

Dilakukan analisa dengan menggunakan spektrofotometer massa terhadap senyawa I dan II. Sebanyak satu miligram

senyawa hasil isolasi dimasukkan dalam alat. Spektrum yang dihasilkan memberikan informasi massa per muatan (m/z) versus kelimpahan relatif dari masing-masing ion pecahan.

Berikut disajikan skema kerja yang telah dilakukan :



Gambar III.1 : Skema isolasi senyawa fraksi kloroform