

BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1. Sampel

Sampel berupa daun dari tanaman *A. elasticus* Reinw (Bendo) yang diambil dari tepi sungai di daerah Tusam, Banyumanik, Semarang Selatan.

3.1.2. Bahan

- n-heksana teknis dan p.a.
- etil asetat teknis dan p.a.
- kloroform teknis dan p.a.
- asam sulfat pekat
- asam asetat anhidrida
- silika gel G-60
- plat KLT
- metanol p.a.
- aseton p.a.
- benzena p.a.
- akuades
- silika gel GF254
- ammonium hidroksida
- kalium iodida
- feri klorida
- iodium

3.1.3. Alat

- Gelas ukur 10 dan 25 ml
- Pipet volume 10 ml
- Erlenmeyer 125 ml
- Plat tetes
- Pengaduk
- Corong
- Pipet tetes
- Gelas KLT
- Kromatografi Kolom Vakum 1 set
- Spatula
- Statif 1 set
- Rotari evaporator 1 set
- Soklet 1 set
- Kertas saring
- Kompor Listrik
- Baker glass 100 ml
- Botol 50, 7, 4 ml
- Lampu UV
- Metler
- Oven
- Melting point Fisher John
- Spektrofotometer UV Shimadzu
- Spektrofotometer IR Jasco FT/IR-5300
- Spektrofotometer Massa Shimadzu

3.2. Metode Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Diponegoro Semarang sedangkan untuk analisis identifikasi senyawa dilakukan di Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga Surabaya.

3.2.1. Perlakuan awal sampel

Daun dari tanaman *A.elasticus* Reinw dikeringkan dalam oven dan dibuat serpihan-serpihan kecil kemudian dibungkus dengan kertas saring berbentuk gelondongan-gelondongan, kemudian diekstrak dengan menggunakan n-heksana sampai negatif triterpenoid. Residu yang diperoleh dari fraksi n-heksana tersebut diekstrak lagi dengan menggunakan pelarut kloroform. Hasil ekstrak kloroform yang diperoleh dipisahkan dengan *rotary evaporator* dan didapatkan krude ekstrak yang berupa pasta berwarna hijau kehitaman.

3.2.2. Pembuatan Pereaksi

Pereaksi yang dibuat untuk identifikasi golongan senyawa adalah sebagai berikut :

- **Pembuatan Pereaksi Lieberman-Burchard**

Terdiri dari anhidrida asam asetat dengan asam sulfat pekat yang disimpan secara terpisah

- **Pembuatan Pereaksi Wagner**

Dalam 10 ml aquades dilarutkan Iodium sebanyak 2,54 gram

dan Kalium Iodida sebanyak 2 gram, kemudian larutan ini diencerkan dengan akuades sampai volume 100 ml. Setelah disaring disimpan dalam botol gelap

- Pembuatan Pereaksi Mayer

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 akuades. Disimpan dalam botol gelap.

- Pembuatan H_2SO_4 2 N

Diencerkan 5,5 ml H_2SO_4 pekat dalam labu takar 100 ml dengan akuades hingga tanda batas

- Pembuatan larutan $FeCl_3$ 1 %

Ditimbang 1 gram $FeCl_3$ dan ditempatkan dalam labu takar 100 ml dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas

3.2.3. Analisa Skrining Fitokimia daun *Artocarpus elasticus* Reinw (Bendo)

Dilakukan analisa skrining fitokimia terhadap daun tanaman *A.elasticus* Reinw, meliputi analisa golongan triterpenoid, steroid, alkaloid, saponin dan fenol.

- Pengujian adanya triterpenoid dan steroid

Sampel sebanyak 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 ditambahkan 10 tetes anhidrida asam asetat dan 1 tetes asam sulfat

pekat. Adanya triterpenoid ditandai perubahan warna merah ungu, sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.

- Pengujian alkaloid

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

- Pengujian saponin

Dua gram sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi. Air ditambahkan sampai seluruhnya terendam air lalu dididihkan, setelah dingin dikocok kuat-kuat. Adanya saponin ditunjukkan oleh adanya busa yang stabil selama 30 menit

- Pengujian Fenol

Sampel ditambah dengan akuades kemudian dipanaskan hingga mendidih, air rebusan dipipet dimasukkan kedalam

tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan FeCl_3 1 % kedalam tabung reaksi tersebut. Adanya senyawa fenol ditandai adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam.

3.2.4. Pembuatan Kromatografi Kolom Vakum (KKV)

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

Fasa diam diaktifkan dalam oven pada suhu $150\text{ }^\circ\text{C}$ selama tiga jam. Setelah dingin ditempatkan dalam kolom dan vakum kondensor dihidupkan sampai fasa diam memadat. Kemudian dielusai dengan fasa gerak yang akan digunakan sampai fasa diam benar-benar homogen.

3.2.5. Isolasi dan Pemurnian Kandungan Ekstrak

Sebelum dilakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan awal dengan KLT, untuk mengidentifikasi banyaknya jenis senyawa dan dapat juga digunakan sebagai penentu jenis eluen yang akan digunakan untuk kromatografi selanjutnya.

Isolasi dilakukan dengan metode KKV, dengan menggunakan gradien pelarut dari non polar ke polar (n-heksana dan etil asetat), caranya adalah sebagai berikut :

Kira-kira 5 gram krude ekstrak kloroform daun tanaman

A.elasticus Reinw dimasukkan dalam KKV dan dielusi dengan campuran n-heksan-etil asetat berdasarkan kenaikan kepolaran (1%, 2%, 3%,.....,100% , n-heksana dalam etil asetat). Setiap kali elusi menggunakan 100 ml pelarut dan dimasukkan dari atas KKV kemudian dihisap dengan vakum kondensor dan eluat yang dihasilkan ditampung dalam botol. Masing-masing botol di KLT dan botol yang mempunyai harga Rf yag sama dikumpulkan kemudian pelarutnya diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi yang kental yang mewakili satu fraksi.

Langkah selanjutnya adalah melakukan pemurnian dengan cara pencucian dan penguapan pelarut terhadap fraksi mayor. Pencucian dilakukan berulang-ulang sampai didapatkan hasil yang murni.

3.2.6. Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

- Uji Lieberman Burchard

Kristal yang dihasilkan dilarutkan dalam kloroform dan ditambah dengan anhidrida asam asetat 10 tetes dan asam sulfat pekat 1 tetes.

- Uji Kelarutan

Dilakukan uji kelarutan terhadap kristal yang diperoleh dengan pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol yang diharapkan mewakili kepolaran dari semua pelarut.

- Uji Titik Leleh

Sampel diletakkan diatas plat kaca *Fisher John Melting Point* dan titik leleh ditunjukkan oleh suhu pada waktu kristal mulai meleleh.

- Analisis Spektroskopi UV

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

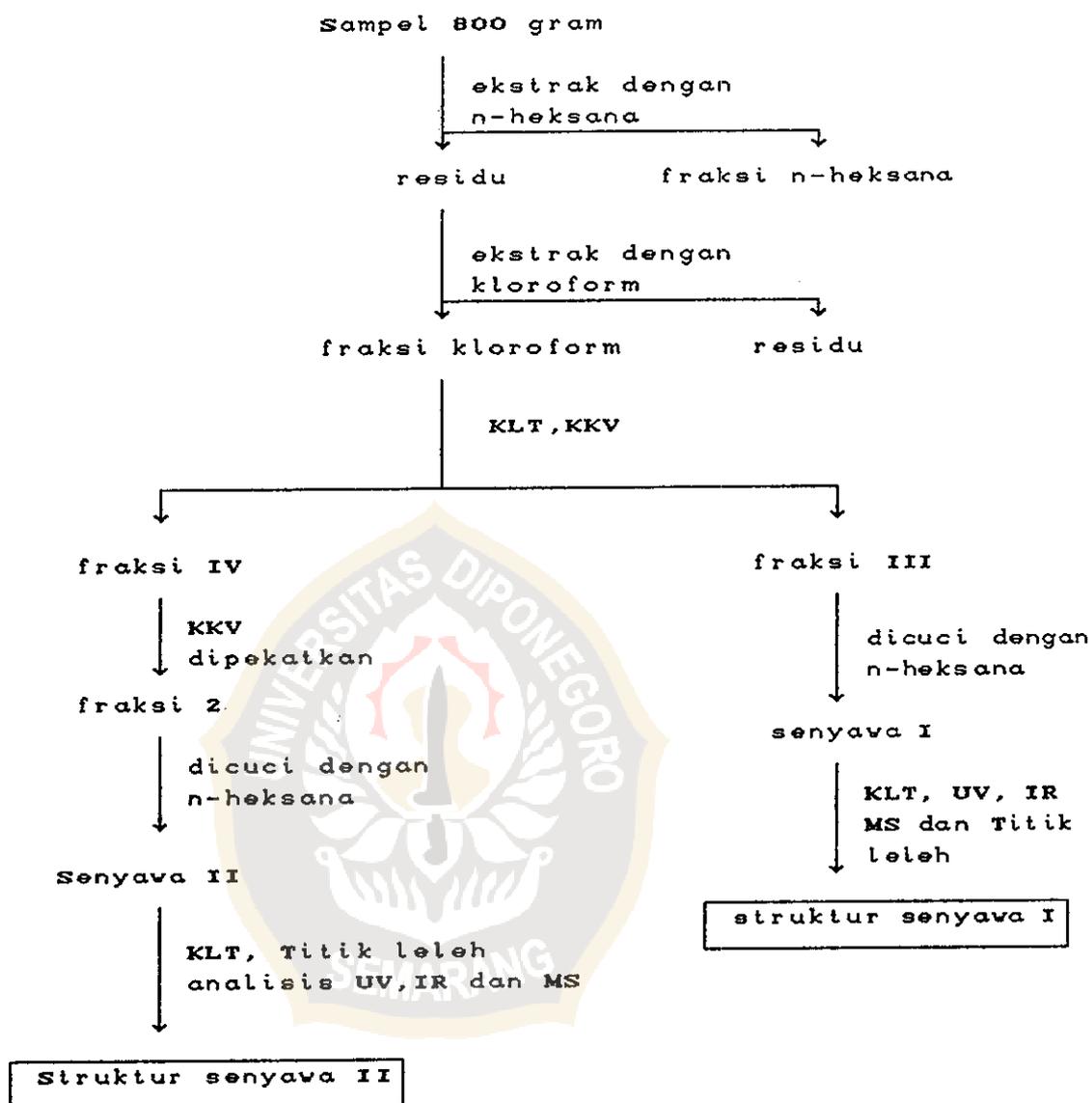
- Analisis Spektra IR

Sebanyak 1 miligram sampel dibuat pelet dengan KBr. Pelet yang dihasilkan dimasukkan dalam alat Infra Merah dan dihasilkan grafik antara % T versus bilangan gelombang yang memberikan informasi adanya gugus fungsional dalam senyawa tersebut.

- Analisis Spektroskopi Massa

Sampel sebanyak 1 mg dimasukkan dalam alat spektrofotometer massa, spektra yang dihasilkan berupa grafik antara limpahan relatif dari masing-masing pecahan versus massa per muatan (m/e).

Skema kerja yang dilakukan dapat dilihat dalam gambar III.1 adalah sebagai berikut :



Gambar III.1. Skema Kerja Isolasi Triterpenoid