

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Bahan dan Alat

##### 3.1.1 Bahan yang digunakan

Daun tumbuhan *B. gymnorhiza* diambil di kawasan Hutan Payau, Tritih, Cilacap Barat.

Pelarut organik yang digunakan untuk ekstraksi dan kromatografi kolom adalah yang berkualitas teknis, sedangkan yang digunakan untuk keperluan analisis dan pencucian digunakan yang berkualitas p.a. Sedangkan bahan kimia lain yang digunakan adalah :

- Anhidrida asam asetat p.a
- Asam sulfat pekat p.a
- Amonium hidroksida p.a
- Raksa (II) klorida p.a
- Kalium Iodida p.a
- Iodium p.a
- Ferri klorida p.a
- N-heksan teknis dan p.a
- Kloroform teknis dan p.a
- Etil asetat teknis dan p.a
- Metanol teknis dan p.a
- Silika gel G 60

- Silika gel 60

### 3.1.2. Alat yang digunakan

- Tabung reaksi
- Plat tetes
- Pipet tetes
- Erlenmeyer
- Gelas beaker
- Gelas ukur
- Corong
- Botol penampung fraksi
- Satu set kromatografi kolom vakum
- Satu set kromatografi kolom biasa
- Oven Listrik
- Neraca analitis
- Satu set peralatan KLT
- Lampu UV
- Alat penentu titik leleh
- Satu set rotary evaporator
- Spektrofotometer UV Shimadzu
- Spektrofotometer IR. Jasco FT / IR 5300
- Spektrofotometer massa Shimadzu

### **3.2 Penyediaan Pereaksi dan Alat-Alat yang Digunakan**

*Pereaksi yang digunakan untuk beberapa uji identifikasi golongan senyawa :*

#### **Pereaksi Lieberman - Burchard**

Pereaksi ini terdiri dari anhidrida asam asetat dengan asam sulfat pekat.

#### **Pereaksi Mayer**

Dalam erlenmeyer 100 ml dilarutkan raksa (II) klorida sebanyak 1,36 gr dan pada tabung reaksi lainnya dilarutkan pula 5 gr KI dalam air 10 ml. Setelah larutan tersebut dicampurkan kemudian diencerkan sampai volumenya menjadi 100 ml dengan air.

Pereaksi ini akhirnya disimpan dalam botol yang berwarna gelap.

#### **Pereaksi Wagner**

Dalam 10 ml air dilarutkan Iodium sebanyak 2,54 gr, KI sebanyak 2 gr, kemudian larutan ini diencerkan dengan air sampai volume keseluruhan menjadi 100 ml. Setelah disaring pereaksi disimpan dalam botol yang berwarna gelap.

*Kromatografi yang digunakan :*

#### **Kromatografi Lapis Tipis ( KLT )**

Kromatografi ini menggunakan KLT siap pakai dengan ukuran tiap plat 20 x 20 cm.

#### **Kromatografi Kolom Vakum (KK Vakum)**

Perangkat kolom vakum dicuci bersih dengan deterjen dan dengan air suling kemudian dikeringkan hingga tidak ada air yang tertinggal. Kolom dibilas dengan pelarut yang akan dipakai sebagai fasa gerak. Kemudian dikeringkan kembali. Adsorben yang diaktifkan dalam oven pada suhu 150 - 160 °C selama 3 - 4 jam kemudian didinginkan. Kolom yang diklem dengan posisi vertikal diatas gabus plastik yang terdapat dalam bagian bawah kolom diberi kertas saring sesuai ukuran kolom.

Selanjutnya kedalam kolom tersebut dimasukkan silika gel sedikit demi sedikit yang sudah disiapkan sambil diketuk-ketuk sampai semua silika rata. Kemudian pompa vakum yang sudah dirangkaikan selanjutnya dihidupkan dan setelah silika gel menjadi padat tambahkan fasa gerak berulang kali sampai diperoleh kolom yang homogen.

### **Kromatografi Kolom Biasa (KK biasa)**

Langkah pertama, kolom dicuci bersih dengan deterjen dan air suling kemudian dikeringkan sehingga tidak ada air yang tertinggal didalam kolom. Setelah itu kolom dibilas dengan pelarut yang akan dipakai sebagai fasa gerak. Silika gel yang diaktifkan dalam oven pada suhu 150 - 160 °C selama 3 - 4 jam, kemudian didinginkan. Kemudian dijadikan dalam bentuk bubuk dalam pelarut. Kolom diklem dengan posisi vertikal diatas gabus plastik yang terdapat dibagian bawah kolom, diberi kertas saring sesuai dengan ukuran kolom. Selanjutnya ke dalam kolom tersebut dimasukkan pelarut sebanyak kira-kira seperempat dari panjang kolom kemudian bubuk silika gel dimasukkan ke dalam kolom hingga bubuk habis kran masih dalam keadaan tertutup. Kemudian kolom yang sudah terisi bubuk silika gel diisi dengan pelarut hingga penuh sementara itu kran tetap dibiarkan terbuka sehingga pelarut keluar sehingga sesekali kolom diketuk-ketuk dengan batangan lunak. Ini dilakukan berulang kali agar serbuk silika gel menjadi padat<sup>20, 21)</sup>.

### **3.2 Metode Kerja**

- **Pengambilan dan Pengolahan sampel**

Daun *B. gymnorrhiza* diambil di Hutan Payau, Tritih Cilacap Barat. Daun dipilih yang baik, diangin-anginkan hingga kering, dipotong kecil-kecil dan diblender.

Jumlah bahan serbuk kering kira-kira 1 Kg.

- **Determinasi Tumbuhan**

Untuk mengetahui jenis tumbuhan yang diambil sebagai bahan percobaan, maka determinasi dilakukan dengan jalan membuat herbarium tumbuhan secara lengkap (daun, bunga, buah, batang, dan akar), kemudian dibandingkan dengan literatur.

- **Uji pendahuluan kandungan kimia**

Golongan senyawa triterpenoid, steroid, alkaloid, saponin dan fenol diperiksa dengan menggunakan pereaksi yang telah dibuat.

#### **Pengujian golongan Triterpenoid dan Steroid**

Setengah gram serbuk kering dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 5 ml kloroform. Dipanaskan sebentar diatas penangas air sambil dikocok-kocok kemudian langsung didinginkan. Larutan hasil ekstrak dipipet dan ditempatkan dalam pelat tetes sebanyak sepuluh tetes serta dibiarkan hingga kering. Setelah itu ditambahkan lima tetes anhidrida asam asetat dan satu tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid. Sedangkan terbentuknya warna biru menunjukkan adanya steroid..

#### **Pengujian adanya saponin**

Setengah gram serbuk kering contoh dimasukkan dalam erlenmeyer. Ke dalam erlenmeyer tersebut ditambahkan sepuluh mililiter air, kemudian dididihkan kira-

kira 2 -3 menit lalu didinginkan. Kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Timbul busa yang stabil selama tidak kurang dari sepuluh menit menunjukkan adanya saponin.

#### **Pengujian adanya fenol**

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

#### **Pengujian adanya alkaloid.**

Sampel 4 gr dihaluskan dalam lumpang porselin kemudian ditambahkan kloroform secukupnya sambil terus dihaluskan. Selanjutnya ditambahkan 10 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  dan dipindahkan dengan jalan menyaring ke dalam tabung reaksi. Cairan hasil saringan ditambah asam sulfat 2N sebanyak 10 tetes. Kemudian dikocok dengan teratur. Cairan bagian atas (asam sulfat + alkaloid) dipipet ke dalam 2 tabung reaksi yang berisi pereaksi Mayer dan pereaksi Wagner. Dengan pereaksi Mayer memberikan endapan putih dan dengan pereaksi Wagner memberikan endapan coklat menunjukkan reaksi positif terhadap alkaloid.

#### **• Pembuatan dan pemeriksaan ekstrak**

Satu kilogram sampel yang sudah berbentuk serbuk halus direndam dalam pelarut n-heksan 3 x 24 jam, kloroform 3 x 24 jam, dan metanol 3 x 24 jam. Ekstrak yang akan digunakan selanjutnya adalah ekstrak metanol. Ekstrak yang akan digunakan diuapkan pelarutnya menjadi kental kemudian diuji golongan senyawanya. Ekstrak kental yang telah diperoleh diuji dengan KLT dengan eluen n-heksan, kloroform,

metanol, etil-asetat + n-heksan, dan campuran etil asetat + kloroform. Untuk menampakkan noda dibantu dengan sinar UV. Lima belas gram ekstrak kental dimasukkan dalam KK Vakum yang telah disiapkan dan dielusi dengan pelarut kloroform, kloroform + etil-asetat, etil-asetat + metanol. Dari proses ini akan diperoleh fraksi-fraksi. Setiap fraksi ditampung dalam botol dan diuji KLT. Fraksi yang memberikan noda yang sama digabung dan diuapkan pelarutnya, sampai diperoleh residu kental. Fraksi I - XII terdiri dari 4 noda dimasukkan dalam KK biasa yang telah disiapkan dielusi dengan pelarut n-heksan, n-heksan + etil-asetat. Dari semua fraksi yang diperoleh fraksi no 90 -105 digabung (senyawa I), dan no 130 - 135 (senyawa II) juga digabung. Kemudian diuapkan pelarutnya dengan cara didiamkan sehingga diperoleh kristal. Kristal yang sudah diperoleh dicuci dengan pelarut n-heksan, dengan pelarut metanol. Sehingga diperoleh kristal putih. Kristal ini ditentukan titik lelehnya, diuji golongannya dan diuji kelarutannya, kemudian dianalisa spektrumnya dengan spektrofotometer UV, IR, dan MS.

- **Pemeriksaan hasil**

- Pengujian titik leleh**

- Pada kaca alat melting point "Fisher John" diletakkan 1 buah kristal hasil isolasi. Pada saat alat dihidupkan selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap kristal maupun skala termometernya. Dicatat titik lelehnya saat kristal mulai meleleh sampai meleleh semua.

- Uji KLT**

- Ditentukan harga R<sub>f</sub>-nya dengan eluen n-heksan : etil asetat.

**Uji Lieberman-Burchard**

Kristal yang dilarutkan dalam kloroform diteteskan pada plat porselin  $\pm$  2 tetes.

Biarkan hingga kering kemudian menambahkan anhidrida asam asetat 4 tetes dan asam sulfat pekat 1 tetes. Dilakukan pengamatan perubahan warna.

**Uji kelarutan**

Pelarut yang digunakan untuk uji kelarutan adalah n-heksan, kloroform, dan metanol.

**Dengan alat spektrofotometer IR**

Kristal dibuat pelet bersama KBr.

**Dengan alat spektrofotometer UV**

Cuplikan dilarutkan dalam kloroform kemudian dimasukkan dalam cuvet dengan ketebalan 1 cm.

**Dengan alat spektrofotometer MS**

Cuplikan padat dimasukkan dalam kolom pipa kapiler kemudian diinjeksikan.

Skema kerja yang dilakukan dapat dilihat pada Lampiran D