

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### **3.1. Sampel, Bahan, Alat**

##### **3.1.1. Lokasi Sampel**

Sampel tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini berupa kulit batang, diambil di Desa Langitan, Kecamatan Tunjungan, Kabupaten Blora, Jawa Tengah. Uji taksonomi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi F-MIPA Universitas Diponegoro.

##### **3.1.2. Bahan**

Pelarut yang digunakan untuk isolasi dan pemisahan, seperti metanol, kloroform, dan *n*-heksana memiliki tingkat kemurnian teknis, sedangkan untuk pemurnian digunakan pelarut dengan tingkat kemurnian p.a (pro analisis), kecuali bila disebutkan lain. Pereaksi yang digunakan untuk skrining fitokimia meliputi : pereaksi Meyer, pereaksi Liberman-Burchard dan  $\text{FeCl}_3$  1%. Plat berlapis silika gel Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub> untuk kromatografi lapis tipis (KLT), silika gel Merck 60 untuk kromatografi kolom (KK) dan silika gel Merck 60 GF<sub>254</sub> untuk kromatografi kolom vakum (KKV).

##### **3.1.3. Alat**

Peralatan gelas yang digunakan adalah peralatan yang biasa digunakan di laboratorium antara lain alat perkolasi, erlenmeyer, satu set peralatan kromatografi kolom, satu set peralatan kromatografi kolom vakum, gelas ukur, gelas arloji, gelas beker, corong gelas, pengaduk, spatula, dan pipet tetes. Lampu UV "Spectroline"

dengan spesifikasi “Long Wave” (365 nm) dan “Short Wave” (254 nm), “rotary evaporator” dari Buchi Switzerland, peralatan “melting point” adalah Fisher John, spektrofotometer UV tipe Milton Roy Spectronic 3000 ARRAY, spektrometer IR tipe Shimadzu FTIR-8201 PC.

### **3.2. Metode Kerja**

Penelitian yang dilakukan meliputi tahap-tahap sebagai berikut:

1. Uji taksonomi tumbuhan, dilakukan di Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi Fakultas MIPA UNDIP.
2. Skrining fitokimia tumbuhan, identifikasi dan isolasi senyawa dilakukan di Laboratorium Penelitian Tugas Akhir Kimia Organik, Jurusan Kimia F-MIPA UNDIP.
3. Analisis penentuan struktur senyawa hasil isolasi dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen, Jurusan Kimia, F-MIPA Universitas Gadjah Mada.

#### **3.2.1. Persiapan Sampel**

Kulit batang tumbuhan *Artocarpus elasticus* dipotong kecil-kecil dan dibiarkan mengering di udara terbuka selama 3 hari, kemudian ditumbuk sampai menjadi serbuk.

#### **3.2.2. Pembuatan Pereaksi**

Pereaksi yang dibuat untuk analisis golongan senyawa adalah sebagai berikut:

### **3.2.2.1. Pereaksi Lieberman-Burchard (untuk uji triterpenoid dan steroid)**

Pereaksi Lieberman-Burchard terdiri dari anhidrida asetat dan asam sulfat pekat yang disimpan terpisah.

### **3.2.2.2. Pereaksi Meyer (untuk uji alkaloid)**

Raksa (II) klorida sebanyak 1,36 gram ditambahkan pada larutan 5 gram kalium iodida (KI) dalam 10 mL akuades. Campuran keduanya diencerkan menjadi 100 mL dengan akuades, disimpan dalam botol warna gelap.

### **3.2.2.3. Larutan Ferri Klorida 1 % (untuk uji senyawa fenolik)**

Dibuat dengan melarutkan 1 gram ferri klorida dalam 100 mL akuades.

### **3.2.3. Pembuatan Kromatografi Kolom**

Kolom kromatografi dengan diameter tertentu dicuci dengan detergen, dibilas dengan air bersih, dikeringkan, dan diklem dengan posisi vertikal. Selanjutnya dicuci dengan pelarut kloroform.

Fasa diam yang digunakan adalah silika gel Merck 60 yang diaktifkan pada suhu 110°C dalam oven kemudian didinginkan, lalu dibuat bubur dengan pelarut kloroform. Kolom diisi dengan sedikit kloroform, kemudian bubur silika gel dimasukkan sedikit demi sedikit sampai habis. Kolom dipenuhi dengan pelarut, kran dibuka sehingga pelarut keluar. Hal ini dilakukan berulang-ulang sampai silika gel menjadi padat.

#### 3.2.4. Pembuatan Kromatografi Kolom Vakum

Kolom kromatografi vakum dicuci dengan detergen, dibilas dengan air bersih dan dikeringkan, kemudian dipasang pada statif dengan posisi vertikal dan dihubungkan dengan pompa vakum. Selanjutnya dicuci dengan pelarut kloroform.

Fasa diam yang digunakan yaitu silika gel Merck 60 GF<sub>254</sub> dimasukkan ke dalam kolom, kemudian disedot menggunakan pompa vakum. Kolom kemudian diisi dengan pelarut kloroform, dan disedot kembali dengan pompa vakum. Hal ini dilakukan berulang-ulang sampai silika gel menjadi padat.

#### 3.2.5. Ekstraksi Sampel

Sampel yang berbentuk serbuk halus sebanyak 930 gram diekstrak dengan cara perendaman dalam perkolator menggunakan pelarut metanol selama 4×24 jam. Setiap 1×24 jam ekstrak ditampung, dan dilakukan pembaharuan pelarut. Ekstrak metanol dipekatkan dengan “rotary evaporator” sampai volumenya menjadi seperlima volume awal. “Crude” ekstrak metanol diekstraksi dengan *n*-heksana hingga diperoleh ekstrak *n*-heksana. Residu dari ekstrak *n*-heksana ini kemudian ditambah dengan kloroform hingga diperoleh ekstrak kloroform. Ekstrak kloroform dipekatkan dengan “rotary evaporator” sampai volumenya menjadi seperlima volume awal.

#### 3.2.6. Analisis Skrining Fitokimia Kulit Batang *Artocarpus elasticus*

Skrining fitokimia yang dilakukan terhadap ekstrak kloroform kulit batang *Artocarpus elasticus* meliputi pemeriksaan golongan triterpenoid, steroid, alkaloid, saponin, dan senyawa fenol.

#### **3.2.6.1. Pengujian Senyawa Triterpenoid dan Steroid**

Sampel ekstrak kloroform ditempatkan dalam plat tetes sebanyak 10 tetes serta dibiarkan hingga kering. Ditambahkan anhidrida asetat (5 tetes) dan asam sulfat pekat (1 tetes). Terbentuknya warna merah-ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan terbentuknya warna biru-hijau menunjukkan adanya steroid.

#### **3.2.6.2. Pengujian Senyawa Saponin**

Sampel ekstrak kloroform dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Ditambahkan ke dalamnya 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.

#### **3.2.6.3. Pengujian Senyawa Fenol**

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

#### **3.2.6.4. Pengujian Senyawa Alkaloid**

Sampel ekstrak kloroform ditambah asam sulfat 2N (10 tetes), dikocok dengan teratur dan ditambahkan ammonium hidroksida ke dalamnya. Cairan bagian atas, yang terdiri dari asam sulfat dan alkaloid, dipipet, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi pereaksi Meyer. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih.

### 3.2.7. Analisis Pendahuluan

Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian dianalisis dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Fasa diam yang digunakan adalah silika gel Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, dengan eluen yang mewakili berbagai tingkat kepolaran, yaitu metanol, etil asetat, kloroform, *n*-heksana, dan campuran dua pelarut. Bercak noda hasil KLT diidentifikasi dengan lampu ultra violet untuk mengetahui jumlah komponen dalam sampel dan kualitas pemisahan. Berdasarkan hasil uji KLT ini telah dapat dipilih eluen yang memberikan pemisahan baik dengan jumlah noda paling banyak.

### 3.2.8. Pemisahan dengan Kromatografi Kolom (KK)

Sampel berupa "gummy mass" (2 gram) dilarutkan dalam sedikit kloroform, ditambah silika gel Merck 60, dan diaduk sampai semua sampel terserap secara homogen. Kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dielusi dengan pelarut kloroform, dilanjutkan dengan metanol. Fraksi-fraksi yang keluar dari kolom ditampung dalam botol-botol kaca 4 mL, kemudian dilakukan uji KLT terhadap fraksi-fraksi tersebut dengan jarak pengujian pada botol ke-1, ke-5, ke-10, ke-15, ke-20, ke-25,..... Fraksi-fraksi yang mempunyai harga R<sub>f</sub> sama digabung menjadi satu, pelarutnya diuapkan. Dari langkah ini diperoleh 11 fraksi yang berupa "crude" ekstrak, setelah pelarutnya diuapkan. Kemudian dipilih 2 fraksi yang menghasilkan "crude" terbanyak, yaitu fraksi II dan VII. Dari hasil pengujian dengan KLT, terhadap fraksi II dilakukan pemurnian, sedangkan

terhadap fraksi VII dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan kromatografi kolom vakum (KKV).

### 3.2.9. Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Vakum (KKV)

Terhadap fraksi VII hasil KK dilakukan pemisahan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom vakum (KKV), karena dari hasil analisis menggunakan KLT ternyata fraksi VII menghasilkan 4 noda. Sampel berupa "gummy mass" dilarutkan dalam sedikit metanol, ditambah dengan silika gel Merek 60. Kemudian dimasukkan dalam kolom dan dielusi dengan pelarut kloroform. Elusi dilanjutkan menggunakan pelarut yang lebih polar melalui kenaikan eluen bergradien, yaitu campuran metanol/kloroform dengan perbandingan berturut-turut (1/9), (2/8), (3/7), dan sebagai eluen terakhir digunakan metanol.

Pemisahan dengan KKV ini menghasilkan 26 fraksi, selanjutnya masing-masing fraksi dievaporasi dan diuji dengan KLT. Terhadap fraksi-fraksi yang menghasilkan "crude" ekstrak terbanyak (fraksi 11, 14, 16, 17) dilakukan pemurnian dan analisis lebih lanjut.

### 3.2.10. Pemurnian

Pemurnian dilakukan terhadap fraksi yang menghasilkan "crude" ekstrak terbanyak, yaitu fraksi II dari hasil KK. Fraksi II ditambah dengan aseton panas kemudian didinginkan, sehingga terbentuk padatan-padatan yang menyerupai kapas dalam larutan jingga. Untuk memurnikannya, padatan tersebut dicuci berulang-ulang dengan aseton dan didapatkan padatan warna putih kekuningan,

(selanjutnya disebut sebagai senyawa I). Sedangkan dari hasil KKV, padatan terbanyak diperoleh dari fraksi-fraksi 11, 14, 16 dan 17. Fraksi 11 dan 14 masing-masing ditambah dengan *n*-heksana dan terbentuk padatan berwarna coklat dalam larutan kuning. Selanjutnya padatan tersebut dicuci dengan *n*-heksana berulang-ulang hingga diperoleh padatan coklat. Kemudian dilakukan uji KLT dengan eluen kloroform, metanol/kloroform (1/1) dan (1/3). Padatan yang diperoleh dari kedua fraksi 11 dan 14 kemudian digabung dalam satu wadah.

Rekristalisasi terhadap senyawa A dilakukan dengan menambahkan metanol, kemudian dipanaskan. Diambil padatan yang tidak larut dalam metanol panas, dilarutkan dalam kloroform, kemudian pelarutnya diuapkan. "Crude" ekstrak yang tersisa ditambah dengan *n*-heksana dan dipanaskan, dilanjutkan dengan penambahan kloroform hingga terbentuk padatan coklat dalam pelarut yang bening. Pelarut yang tersisa kemudian dipipet, padatan coklat yang terbentuk dikeringkan, dan selanjutnya disebut senyawa A.

Fraksi 16 dan 17 juga dicuci dengan *n*-heksana, menghasilkan padatan coklat. Dari uji KLT dengan eluen kloroform, metanol, metanol/kloroform (1/1) dan (1/3), kedua padatan tersebut digabung menjadi satu. Kemudian dilakukan rekristalisasi yang sama dengan langkah rekristalisasi senyawa A, diperoleh padatan warna coklat, yang selanjutnya disebut sebagai senyawa B. Terhadap senyawa A dan B dilakukan uji KLT menggunakan eluen metanol, metanol/kloroform (1/1) dan (1/3), kemudian keduanya digabung menjadi senyawa II



### **3.2.11. Analisis Senyawa Hasil Isolasi**

#### **3.2.11.1. Analisis golongan senyawa**

##### **1. Analisis Lieberman Burchard**

Terhadap senyawa I dan II dilakukan analisis golongan triterpenoid dan steroid menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard. (Analog dengan skrining fitokimia pada 3.2.6.2).

##### **2. Analisis Senyawa Fenol**

Analisis senyawa fenol terhadap senyawa I dan II dilakukan menggunakan pereaksi ferri klorida 1% (Analog dengan skrining fitokimia pada 3.2.6.3).

##### **3. Analisis Gula**

Terhadap senyawa II dilakukan analisis gula menggunakan pereaksi Fehling. Diambil sedikit senyawa II, dilarutkan dalam kloroform, kemudian ditambah dengan larutan Fehling A dan Fehling B, kemudian dipanaskan. Adanya gula ditandai dengan terbentuknya warna hijau atau endapan merah bata.

#### **3.2.11.2. Analisis Kelarutan**

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

#### **3.2.11.3. Analisis Titik Leleh**

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

#### 3.2.11.4. Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam kloroform. kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dengan eluen kloroform, metanol, *n*-heksana dan campuran diantara beberapa eluen tersebut. Sebagai penampak bercak digunakan lampu ultra violet.

#### 3.2.11.5. Analisis Spektroskopi

Terhadap senyawa I dan II dilakukan analisis secara spektrometri menggunakan spektrofotometer ultra violet dan infra merah, yang dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen , Universitas Gadjah Mada.

#### 3.2.12. Hidrolisis Asam terhadap Senyawa II

Senyawa II (1,5 mg) ditambah dengan 5 mL HCl 2N dan metanol dengan perbandingan (1:1), kemudian direfluks selama  $\pm$  2 jam. Hasil refluks dievaporasi untuk menguapkan metanol dengan “rotary evaporator”, dilanjutkan dengan penambahan NaOH 1N beberapa tetes, hingga larutan netral (pH :  $\pm$  7). Larutan netral tersebut kemudian diekstraksi dengan dietil eter, diperoleh 2 fraksi yaitu fraksi air dan fraksi eter.

Fraksi air diuji dengan pereaksi Fehling, dan dianalisis dengan kromatografi kertas menggunakan eluen butanol-asam asetat-air( 4:1:5) dan butanol-etanol-air (4:1:2,2). Sebagai penampak noda digunakan pereaksi penyemprot yang terdiri dari satu bagian asam ortofosfat 85% ditambah 10 bagian larutan difenilamina (1 g) dan anilin (1g) dalam 100 mL aseton. Kertas yang telah disemprot dengan pereaksi tersebut di atas kemudian dipanaskan pada suhu  $\pm$

110°C selama 5 menit. Nilai Rf yang diperoleh dibandingkan dengan literatur (Harborne, 1987)<sup>[17]</sup> untuk menentukan jenis gula. Fraksi air yang tersisa diuapkan, hingga diperoleh kristal gula berwarna putih.

Terhadap fraksi eter dilakukan uji golongan yaitu : uji senyawa fenolik (analog dengan 3.2.6.3), uji triterpenoid dan steroid (analog dengan 3.2.6.2) dan uji alkaloid (analog dengan 3.2.6.4), untuk menentukan jenis aglikon hasil hidrolisis.

Skema kerja yang telah dilakukan, selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 1 (halaman 42).

