

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Sampel, Alat dan Bahan

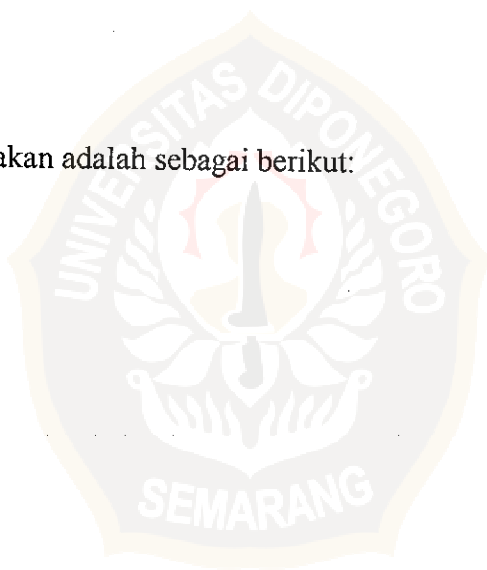
3.1.1 Sampel

Sampel berupa daun *Tithonia diversifolia* Gray yang diambil di Bukit Gombel Semarang pada bulan April 1998.

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut:

- *n*-heksan teknis
- Kloroform p.a., teknis
- Etil asetat teknis
- Metanol p.a., teknis
- Aseton p.a., teknis
- Eter p.a.
- Benzen p.a.
- Anhidrid asetat p.a.
- Asam sulfat p.a.



- Kalium iodida p.a.
- Raksa (II) klorida p.a.
- Besi (III) klorida 1%
- Asam klorida p.a.
- Silika Gel 60 G
- Silika Gel 254
- Plat KLT
- Aquadest
- Kertas saring
- Timbal asetat 4% p.a.
- Etanol 95% p.a.
- Kristal I₂ p.a.



3.1.3 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah sebagai berikut:

- Perkolator
- Gelas beker
- Gelas ukur

- Erlenmeyer
- Labu takar
- Pipet ukur
- Pipet tetes
- Corong gelas
- Pengaduk
- Spatula
- Plat tetes
- Tabung reaksi
- Botol gelas
- Pipa kapiler
- Lampu Ultra Violet
- Chamber KLT
- Satu set kromatografi kolom
- Satu set rotary evaporator dari Buchi Switserland
- Neraca
- Oven



- Penangas
- Fisher John Melting Point
- Spektrofotometer Ultra Violet tipe Milton Roy Spectronis 3000 ARRAY
- Spektrofotometer Infra Red Shimadzu FTIR - 8201 PC

3.2 Metode Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Tugas Akhir Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro Semarang, sedangkan analisa spektroskopi Ultra Violet dan Infra Merah senyawa dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.2.1 Persiapan Sampel

Daun *Tithonia diversifolia* Gray dipotong- potong halus, kemudian diangink- anginkan hingga kering.

3.2.2 Pembuatan Kromatografi Kolom

Kolom kromatografi yang telah bersih dan dibilas dengan *n*-heksana dipasang vertikal pada statif yang telah dilengkapi dengan klem.

Adsorben silika gel 60 G diaktifkan dalam oven pada suhu 110°C selama 2 x 24 jam. Setelah dingin, silika gel 60 G dibuat menjadi bubuk, menggunakan pelarut kloroform : *n*-heksana (2:3). Bubur silika dimasukkan ke dalam kolom yang telah

diisi eluen kloroform : *n*-heksana (2:3). Adsorben dielusi dengan kloroform : *n*-heksana (2:3) sambil dipukul pelan-pelan pada sisi kolom hingga adsorben padat.

3.2.3 Analisa skrining fitokimia.

Dilakukan analisa skrining fitokimia terhadap ekstrak kasar daun *Tithonia diversifolia*, Gray dan kristal hasil isolasi meliputi:

a. Pengujian senyawa triterpenoid dan steroid dengan pereaksi Liebermann Burchard

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan kloroform. Selanjutnya dipanaskan sebentar di atas penangas air sambil dikocok-kocok, kemudian didinginkan. Filtrat dipipet dan ditempatkan dalam plat 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.

b. Pengujian senyawa saponin

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan ke dalamnya 10 mL air dan dididihkan kiri-kira 2-3 menit kemudian didinginkan. Kocok kuat-kuat selama 10 menit. Timbulnya busa stabil selama 10 menit menunjukkan adanya saponin.

c. Pengujian senyawa fenol

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan larutan besi (III) klorida ke dalamnya dan dididihkan. Adanya senyawa fenol ditandai terjadinya perubahan warna dari hijau sampai hitam.

d. Pengujian senyawa alkaloid dengan pereaksi Meyer.

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi pereaksi Meyer. Terbentuknya endapan putih dalam pereaksi Meyer menunjukkan adanya alkaloid. Pereaksi Meyer dapat dibuat dari 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.

e. Pengujian adanya minyak atsiri

Pengujian adanya minyak atsiri dilakukan dengan cara meremas-remas daun paitan, maka akan tercium bau khas.

f. Pengujian adanya sesquiterpen lakton

Sejumlah kecil sampel dilarutkan dalam etanol 95%, lalu ditambahkan larutan timbal asetat 4%. Larutan disaring dan filtrat dipekatkan. Campuran air-minyak diekstraksi dengan kloroform, ekstrak yang diperoleh dikeringkan, lalu

diuapkan. Sisa dianalisa langsung dengan KLT. Untuk kristal hasil isolasi langsung diidentifikasi dengan KLT.

KLT dilakukan pada silika gel G memakai benzen – aseton (4:1). Lakton dapat dideteksi berupa bercak coklat bila pelat yang telah dikembangkan diletakkan dalam bejana yang berisi kristal iodium.

3.2.4 Ekstraksi sampel

Sampel daun paitan sebanyak ± 1 kg diekstraksi dengan cara perendaman dalam perkolator menggunakan *n*-heksana selama 2 x 24 jam sekali dituang dan disaring. Ekstrak *n*-heksana dipekatkan dalam pemekat vakum berputar (rotary vaporator) sampai volumenya menjadi seperlima volume awal.

3.2.5 Analisa Pendahuluan

Ekstrak yang pekat tersebut dianalisa lebih lanjut menggunakan KLT dengan berbagai eluen, yaitu *n*-heksana, 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 dipilih yang memberikan pemisahan noda yang baik.

3.2.6 Pemisahan dengan kromatografi kolom

Sebanyak 1,3 gram ekstrak kasar dilarutkan dalam sedikit *n*-heksana dan ditambahkan silika gel 60 G sampai semua sampel terserap. Kemudian dimasukkan

ke dalam kolom dan dielusi menggunakan campuran pelarut *n*-heksana : kloroform (3 : 2). 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 dibiarkan menguap hingga diperoleh fraksi kental.

3.2.7 Pemurnian

Terhadap fraksi II dilakukan proses pemurnian dengan cara rekristalisasi menggunakan aseton. Rekristalisasi diulang beberapa kali hingga diperoleh kristal putih.

3.2.8 Analisa senyawa hasil isolasi.

a. Analisa golongan senyawa

Uji golongan senyawa yang dilakukan meliputi uji dengan pereaksi Liebermann-Burchard, uji saponin, uji fenol, uji dengan pereaksi Meyer, uji adanya sesquiterpen lakton. Cara kerja dapat dilihat pada sub bab 3.2.2.

b. Analisa KLT

Untuk menguji kemurnian kristal hasil isolasi dapat dilakukan analisa KLT dengan beberapa pelarut seperti *n*-heksana, kloroform, aseton, metanol dan campuran beberapa pelarut. Noda tunggal yang dihasilkan berarti kristal telah murni.

c. Uji titik leleh

Dilakukan uji titik leleh terhadap kristal hasil isolasi dengan alat Fisher John Melting Point. Sejumlah kecil senyawa hasil ditempatkan pada plat kaca alat, kemudian diamati sampai senyawa mencair.

d. Analisa spektrum Ultra Violet

Dilakukan analisa spektroskopi ultra violet terhadap kristal hasil isolasi. Sejumlah kecil kristal dilarutkan dalam kloroform kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan disinari dengan sinar UV. Spektrum yang dihasilkan menunjukkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh senyawa.

e. Analisa spektrum Infra Merah

Dilakukan analisa dengan menggunakan spektroskopi IR terhadap kristal hasil isolasi dengan menggunakan pelet KBr. Sampel sebanyak 1 miligram dibuat menjadi pelet dengan 100 miligram KBr kemudian dimasukkan ke dalam alat.

Skema kerja penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 2.