

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Sampel, Alat dan Bahan

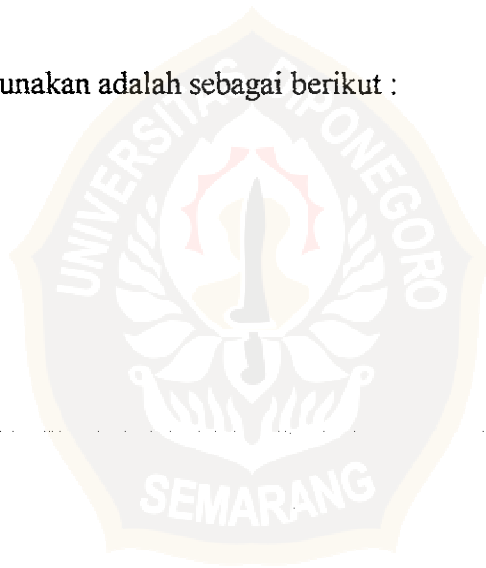
3.1.1 Sampel

Sampel tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini berupa kulit batang *Artocarpus elasticus* yang diambil di Desa Langitan, Kecamatan Tunjungan, Kabupaten Blora, Jawa Tengah.

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut :

- *n*-heksana teknis dan p.a
- kloroform teknis dan p.a
- etil asetat teknis dan p.a
- eter p.a
- anhidrida asetat
- asam sulfat pekat
- aquadest
- kalium iodida
- raksa (II) klorida
- besi (II) klorida 1%
- silika gel G 60
- plat KLT
- kertas saring



3.1.2 Alat

Peralatan yang digunakan adalah sebagai berikut :

- perkolator
- gelas beaker
- gelas arloji
- erlenmeyer
- pipet tetes
- corong gelas
- pengaduk
- spatula
- plat tetes
- tabung reaksi
- botol gelas
- pipa kapiler
- satu set kolom kromatografi
- satu set rotary evaporator
- timbangan
- oven
- penangas
- lampu UV "Spectroline"
- Fisher John Melting Point
- Spektrometer UV tipe Milton Roy Spectronic 300 ARRAY
- Spektrometer IR tipe Shimadzu FT/IR 8201 PC



3.2. Cara Kerja

Penelitian yang dilakukan meliputi tahap-tahap skrining fitokimia tumbuhan, identifikasi dan isolasi senyawa dilakukan di Laboratorium Penelitian Tugas Akhir Kimia Organik, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang. Sedangkan analisis penentuan struktur senyawa hasil isolasi dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen, Jurusan Kimia FMIPA UGM Yogyakarta.

3.2.1 Persiapan Sampel

Kulit batang *Artocarpus elasticus* dipotong kecil-kecil dan dikeringanginkan, kemudian dihaluskan dengan cara ditumbuk sampai berupa serbuk.

3.2.2 Pembuatan Pereaksi

Pereaksi yang digunakan untuk analisis golongan senyawa adalah sebagai berikut :

a. Pereaksi Liebermann-Buchard

Pereaksi ini digunakan untuk uji golongan triterpeoid dan steroid yang terdiri dari anhidrida asetat dan asam sulfat pekat yang disimpan secara terpisah.

b. Pereaksi Meyer

Raksa (II) klorida sebanyak 1,36 g ditambahkan pada larutan 5 g kalium iodida (KI) dalam 10 ml aquadest. Campuran keduanya diencerkan menjadi 100 ml dengan aquadest, disimpan dalam botol warna gelap. Pereaksi Meyer ini digunakan untuk uji alkaloid.

c. Larutan Ferri Klorida 1%

Larutan ini digunakan untuk uji senyawa fenolik yang dibuat dengan melarutkan 1 g ferri klorida dalam 100 ml aquadest.

3.2.3 Ekstraksi Sampel

Sampel berupa serbuk kulit batang *Artocarpus elasticus* sebanyak 1 kg diekstraksi menggunakan perkolator dengan pelarut metanol selama 4×24 jam. Setiap 24 jam ekstrak ditampung dan dilakukan pergantian pelarut. Fraksi metanol hasil ekstraksi dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai volumenya menjadi $1/5$ volume awal. *Crude* ekstrak metanol yang dihasilkan diekstrak kembali dengan pelarut *n*-heksana. Fraksi *n*-heksana yang diperoleh dipekatkan kembali menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan *crude* ekstrak *n*-heksana.

3.2.4 Pemeriksaan Golongan Senyawa

Crude n-heksana yang dihasilkan, selanjutnya dilakukan analisis skrining fitokimia sebagai berikut :

a. Pengujian adanya Triterpenoid dan Steroid

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dikocok dengan kloroform selama 15 menit. Larutan hasil ekstrak diambil 10 tetes dan ditempatkan pada plat tetes lalu dibiarkan sampai kering. Sampel yang telah kering ditambah 5 tetes anhidrida asetat dan satu tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditandai perubahan warna merah ungu, sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.

b. Pemeriksaan adanya Fenol

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah aquadest, lalu dipanaskan sampai mendidih. Air rebusan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang lain kemudian ditambahkan FeCl_3 1%. Adanya senyawa fenol ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari hijau sampai hitam.

c. Pemeriksaan adanya Alkaloid

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi Meyer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

d. Pemeriksaan adanya Saponin

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah aquadest, didihkan selama 2-3 menit lalu didinginkan. Selanjutnya sampel dikocok kuat-kuat. Apabila timbul busa yang stabil selama tidak kurang 10 menit, maka menunjukkan adanya senyawa saponin.

3.2.5 Analisis Pendahuluan

Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah silika gel Merck Kieselgel GF₂₅₄, dengan fasa gerak berupa eluen yang mewakili berbagai tingkat kepolaran yaitu metanol, etil asetat, kloroform, *n*-heksana dan kombinasi dua pelarut. Sampel ditotolkan ke lempeng KLT kemudian dielusi dengan fase geraknya. Bercak noda hasil KLT diidentifikasi dengan lampu UV untuk mengetahui jumlah komponen dalam sampel dan kualitas pemisahan. Berdasarkan hasil uji KLT ini

telah dapat dipilih eluen yang memberikan pemisahan yang baik dengan jumlah noda paling banyak.

3.2.6 Pembuatan Kolom Kromatografi

Kolom kromatografi dengan diameter tertentu dicuci bersih dengan deterjen dan air kran, kemudian dikeringkan. Silika gel G 60 digunakan sebagai adsorben yang diaktifkan pada suhu 110° C sebanyak 40 g dalam oven, lalu didinginkan dengan mendinginkannya pada udara terbuka dan selanjutnya dibuat bubuk dengan pelarut kloroform. Kolom kromatografi yang telah bersih diklem pada posisi vertikal dan bagian bawah kolom dilapisi dengan kapas. Kolom diisi dengan pelarut sampai setengah bagian, kemudian bubuk silika gel dimasukkan ke dalam kolom seluruhnya sedikit demi sedikit. Kolom dipenuhi dengan pelarut lalu kran dibuka sehingga pelarut keluar. Ketika kran dibuka, kolom diketuk pelan-pelan. Hal ini dilakukan berulang-ulang sampai silika gel menjadi padat.

3.2.7 Pemisahan dengan Kolom Kromatografi

Sampel berupa *gummy mass* (1 g) dilarutkan dalam sedikit kloroform, ditambah silika gel Merck 60 dan diaduk sampai semua sampel terserap secara homogen. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam kolom dan dielus dengan pelarut kloroform. Fraksi-fraksi yang keluar dari kolom ditampung dalam botol-botol kaca 5 ml kemudian dilakukan uji KLT terhadap fraksi-fraksi tersebut dengan jarak pengujian 1,5,10,15...dst. Fraksi-fraksi yang memiliki harga R_f yang sama digabung menjadi satu dan pelarutnya diuapkan. Dari langkah ini diperoleh 6 fraksi yang berupa *crude*. Langkah selanjutnya adalah melakukan uji

Liebermann-Buchard untuk mengetahui fraksi mana yang positif mengandung triterpenoid.

3.2.8 Pemurnian

Pemurnian dilakukan terhadap fraksi yang menghasilkan *crude* terbanyak dan positif terhadap uji Liebermann-Buchard yaitu fraksi ke III dari hasil kolom kromatografi. Pemurnian terhadap fraksi III dilakukan dengan menggunakan kombinasi pelarut eter-metanol (1:5). Fraksi III ditambah eter dan dipanaskan, kemudian didinginkan dan ditambah metanol sehingga terbentuk padatan-padatan yang menyerupai kapas. Untuk memurnikannya, padatan tersebut dicuci berulang-ulang dengan metanol sampai didapatkan padatan berwarna putih.

3.2.9 Analisis Senyawa Hasil Isolasi

Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan beberapa analisis sebagai berikut:

a. Analisis golongan senyawa triterpenoid dan steroid

Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan analisis golongan triterpenoid dan steroid menggunakan pereaksi Liebermann-Buchard (analog dengan skrining fitokimia 3.2.6.b).

b. Analisis senyawa fenolik

Analisis senyawa fenolik terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan pereaksi ferri klorida 1% (analog dengan skrining fitokimia 3.2.6.c).

c. Analisis kelarutan

Dilakukan analisis kelarutan senyawa hasil isolasi menggunakan berbagai pelarut yang diharapkan dapat mewakili tingkat-tingkat kepolaran seperti : *n*-heksan, kloroform, etil asetat, eter, dan metanol.

d. Analisis titik leleh

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

e. Analisis kromatografi lapis tipis

Senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam kloroform, kemudian ditempelkan pada lempeng KLT dengan eluen kloroform, metanol, eter, *n*-heksana dan kombinasinya. Sebagai penampak bercak digunakan lampu UV.

f. Analisis spektroskopi

Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan analisis secara spektrometri menggunakan Spektrofotometer Ultraviolet dan Inframerah yang dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FMIPA UGM Yogyakarta.