BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1. Lokasi Sampel

Dalam penelitian tidak menggunakan variabel apapun. Sampel tumbuhan *Solanum indicum*, Linn diambil dari beberapa daerah dataran tinggi yaitu Salatiga, Purbalingga dan Ungaran. Sampel tumbuhan yang digunakan untuk penelitian adalah buah yang sudah tua.

3.1.2. Bahan-bahan

Pelarut yang digunakan untuk isolasi adalah yang berkualitas teknis, sedangkan untuk analisis digunakan yang berkualitas p.a. Bahan-bahan yang digunakan :

1. Amonium hidroksida
2. Asam asetat anhidrid
3. Asam sulfat pekat
4. Aseton
5. Aquades
6. Etil asetat
7. Ferri klorida
8. Iodium
9. Kalium iodida
10. Kertas saring
11. Kloroform
12. Metanol
13. n-heksan
14. Lempeng KLT
15. Silika gel 60 H
16. Antimon (III) klorida
17. Natrium hidroksida
18. Merkuri klorida

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

3.1.3. Alat-alat

Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini adalah :

1. Botol 50 ml, 10 ml, 4 ml
2. Corong kaca
3. Dropperlplate
4. Erlenmayer 200 ml
5. Gelas ukur 10 ml, 25 ml
6. Gelas beaker 100, 150, 250 ml
7. Gelas arloji
8. Labu takar 100 ml
9. Lampu UV
10. Lempeng porselin
11. Oven listrik
12. Pengaduk
13. Pemanas listrik
14. Penjepit
15. Lampu spiritus
16. Pemanas air
17. Pipet tetes
18. Spatula
19. Seperangkat evaporator
20. Seperangkat GC-MS
21. Seperangkat UV-Vis
22. Seperangkat KKV
23. Seperangkat KLT
24. Seperangkat maserasi
25. Corong pemisah
26. Termometer 110^0 C
27. Tabung reaksi
28. Sprayer botol

3.2. Metode Kerja

3.2.1. Identifikasi Tumbuhan dan Pembuatan Herbarium

Identifikasi tumbuhan dapat dilakukan dengan cara determinasi terhadap tumbuhan atau terhadap herbarium. Sampel tumbuhan diambil dari Salatiga, Purbalingga, dan Ungaran. Kemudian spesimen herbarium tumbuhan sampel dibuat dengan cara sasak, yaitu :

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Sampel tumbuhan diambil bagian-bagiannya, daun, bunga, buah, batang dan akarnya yang bagus. Kemudian diatur sedemikian rupa diatas kertas koran atau manila sehingga bagian-bagian dari masing-masing terlihat jelas. Bagian atas diberi sasak dan diikat kemudian dijemur di bawah sinar matahari. Setelah kering, tumbuhan ini ditempelkan pada kertas herba dan diberi sampel transparan. Penentuan jenis tumbuhan menggunakan buku kunci determinasi.

3.2.2. Pembuatan Pereaksi Yang Digunakan Untuk Identifikasi Golongan Senyawa

Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 gram merkuri klorida yang dilarutkan dalam 60 ml aquades dan 5 gram Kalium Iodida yang dilarutkan dalam 10 ml aquades. Kedua larutan ini dicampur dan diencerkan sampai 100 ml.

Pereaksi Wagner

Sebanyak 2,54 gram Iodium dan 2 gram Kalium Iodida yang dilarutkan dalam 10 ml aquades kemudian diencerkan menjadi 100 ml dan disaring.

Larutan $FeCl_3$ 1 %

Sebanyak 1 gram $FeCl_3$ dilarutkan dengan aquades kemudian diencerkan menjadi 100 ml.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Pereaksi Liebermann – Burchard

Pereaksi ini terdiri dari asam asetat anhidrid dan asam sulfat pekat yang disimpan dalam botol warna coklat secara terpisah.

3.2.3. Penggunaan Lempeng Kromatografi Lapis Tipis

Untuk menganalisis jumlah senyawa dalam ekstraksi digunakan plat KLT jadi dengan penyerap silika gel. Penyerap ini dalam KLT berlaku sebagai fasa diam. Plat KLT yang digunakan untuk analisis dengan ukuran panjang 10 cm dan lebar 1 cm. Plat KLT sebelum digunakan untuk menganalisis diaktifkan terlebih dahulu dengan cara dipanaskan dalam suhu 110^0 C selama 30 menit.

3.2.4. Pembuatan Kolom untuk Kromatografi Kolom Vakum

Kolom kaca untuk kromatografi kolom vakum yang digunakan berdiameter 5 cm. Sebelum digunakan dicuci dengan air detergen dibilas sampai bersih kemudian dicuci dengan seton dan dikeringkan. Terakhir dicuci dengan heksan yang akan digunakan untuk mengelusi kolom. Bubur silika dibuat dengan mencampur silika dengan heksan. Sebelum heksan dimasukkan ke dalam kolom, kolom diisi dulu dengan silika gel 60 H sebanyak 120 gram sampai memadat. Kemudian krude sampel sebanyak 3 gram yang telah dicampur dengan silika gel dimasukkan diatasnya. Setelah itu heksan dialirkan untuk memadatkan bubur silika sampai tidak muncul gelembung-gelembung udara, kemudian dialasi dengan kertas saring.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Kolom silika harus dijaga jangan sampai terjadi retakan-retakan pada bubur silika. Vakum dipasang pada saat elusi terhadap sampel dilakukan dan botol yang telah diberi nomor disiapkan untuk menampung hasil kromatografi.

3.2.5. Skrining Fitokimia

Pemeriksaan golongan senyawa kimia yang dilakukan terhadap buah *Solanum indicum*, Linn adalah golongan alkaloid, triterpen, steroid, fenol, dan saponin.

Uji adanya Alkaloid

Sampel sebanyak 4 gram digerus dalam lempeng porselin. Ke dalamnya ditambahkan kloroform, lalu ditambah dengan amonium hidroksida 10 ml, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah dengan asam sulfat 2 N 10 tetes dan dikocok.

Lapisan atas diambil dan diteteskan pada dropperplate, lalu ditest dengan pereaksi Wagner dan Mayer. Uji ini positif bila memberikan endapan coklat terhadap pereaksi Wagner dan endapan putih pada pereaksi Mayer.

Uji adanya Triterpen dan Steroid

Sebanyak 100 gram sampel diekstrak dengan kloroform. Filtrat diambil dan diteteskan pada dropperplate, dibiarkan mengering. Ditetesi dengan asam asetat anhidrid 5 tetes dan asam sulfat pekat 1 tetes.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Terbentuknya warna biru menunjukkan adanya steroid dan warna merah ungu menunjukkan adanya triterpen.

Uji adanya Fenol

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah aquades kemudian didihkan. Filtrat diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi lain ditambahkan larutan $FeCl^3$ 1 %. Perubahan warna dari hijau sampai dengan hitam menunjukkan adanya fenol.

Uji adanya Saponin

Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah aquades mendidih. Setelah dikocok kuat-kuat. Adanya buih yang stabil selama 30 menit menunjukkan adanya saponin.

3.2.6. Perlakuan Terhadap Sampel

Sampel buah dari *Solanum indicum,* Linn diiris tipis-tipis untuk memudahkan pengeringan dan dijemur sampai kering. Kemudian dibuat serbuk dengan diblender dan dikeringkan lagi. Serbuk sampel sebanyak 450 gram dimaserasi dengan pelarut n-heksan 1 liter selama 3 x 24 jam untuk menghilangkan kandungan senyawa dan pengotor yang bersifat non polar. Maserasi dilanjutkan dengan pelarut kloroform dalam suasana basa selama 3 x 24 jam. Maserasi dihentikan bila pelarutnya sudah habis dan tidak ada lagi hasil maserasi yang menetes. Semua hasil maserasi ditampung dan dipekatkan dengan evaporator. Kemudian hasil evaporasi diekstraksi dengan kloroform dalam suasana asam. Hasil ekstraksi merupakan fraksi kloroform. Analisis test Mayer dan Wagner dilakukan

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

untuk mengidentifikasi adanya alkaloid dalam fraksi kloroform. Kemudian dievaporasi untuk mendapatkan krude.

3.2.7. Isolasi dan Pemurnian Kandungan Ekstraksi

Krude yang dihasilkan dianalisis dengan KLT untuk menentukan eluen yang tepat sebelum dilakukan kromatografi kolom vakum. Dari hasil KLT didapat eluen yang baik untuk memisahkan komponen dalam krude adalah n-heksan : kloroform.

Kromatografi kolom vakum yang dipakai untuk pemisahan krude menggunakan fasa diam silika gel 60 H sebanyak 120 gram. Sampel yang berbentuk pasta sebanyak 3 gram dicampur dengan silika gel dimasukkan ke dalam kolom yang telah dipadatkan, dielusi dengan pelarut n-heksan kemudian dengan pelarut kloroform menggunakan gradien pelarut.

Dari hasil kromatografi kolom vakum berupa larutan yang ditampung dalam botol-botol yang telah diberi nomor dan diidentifikasi ada tidaknya alkaloid dalam masing-masing botol tersebut. Hasil dari larutan yang positif mengandung alkaloid dimurnikan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif.

3.2.8. Penentuan Jenis Senyawa

Untuk analisis senyawa alkaloid digunakan GC-MS dan UV-Vis. Penentuan jenis dan struktur senyawa alkaloid yang dicari dibandingkan dengan referensi yang sudah ada. Perbandingan antara hasil analisis dan referensi menunjukkan adanya senyawa alkaloid yang dicari.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)