

BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel Bahan dan Alat

3.1.1. Sampel

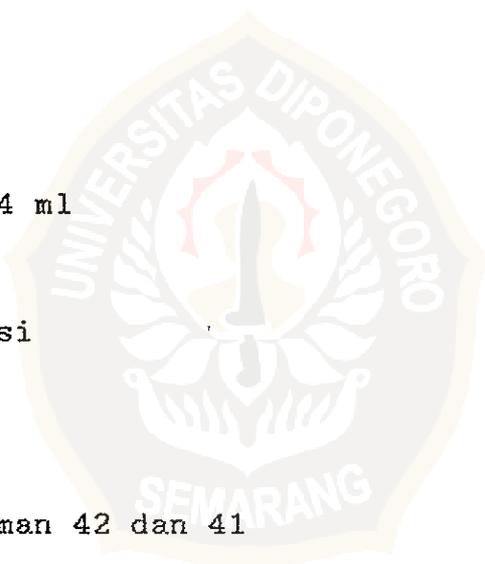
Sampel berupa daun dari jenis *Artocarpus Elasticus Reinw Ex B₁* (Bendo) yang diambil dari tepi sungai di daerah Tusam Banyumanik, Semarang Selatan.

3.1.2. Bahan

- n-Heksan teknis yang didistilasi ulang.
- Asam Asetat Anhidrida p.a
- Asam Sulfat pekat p.a
- Iodium p.a
- Kalium Iodida p.a
- Raksa(II) Klorida p.a
- Kloroform p.a. dan teknis
- 1% FerriKlorida
- Asam Klorida pekat p.a.
- Logam Magnesium
- Etil Asetat teknis
- Metanol p.a. dan teknis
- Silika Gel G-60
- Plat KLT.

3.1.3. Alat

- Gelas ukur 10 ml
- Gelas ukur 100ml
- Pipet volume 1 ml
- Gelas Arloji
- Gelas KLT
- Beker glass
- Lumpang porselen
- Plat tetes
- Corong
- Kolom Kromatografi
- Lampu UV
- Pengaduk
- Spatel
- Botol 50,7,4 ml
- Set statif
- Set distilasi
- Set soklet
- Pipet tetes
- Kertas Whatman 42 dan 41
- Kertas saring
- Erlenmeyer
- Penangas air
- Termometer
- Tabung reaksi
- Lampu spiritus
- Kompor listrik



- Evaporator
- Metler
- Melting Point Fiesher John
- Spektrofotometer UV
- Spektrofotometer IR
- Oven
- Plat preparatif
- Spektrofotometer Massa

3.2. Metode Kerja

3.2.1. Identifikasi Spesies Tanaman

Untuk mengetahui spesies tanaman dilakukan dengan membuat herbarium berupa daun untuk selanjutnya identifikasi dilakukan di Herbarium Bogoriense LIPI Biologi, Bogor. Dan dihasilkan bahwa tanaman tersebut dari jenis *Artocarpus elasticus* Reinw Ex B₁.

3.2.2 Di Laboratorium

3.2.2.1. Pembuatan Pereaksi yang Digunakan Untuk

Identifikasi Golongan Senyawa

a) Pereaksi Lieberman-Burchard.

Asam Asetat Anhidrida + Asam Sulfat Pekat (Disimpan terpisah).

b) Pereaksi Wagner

1,27 gram Iodium ditambah 1 gr KI dilarutkan dalam 5 ml

air suling hingga volume jadi 50 ml. Setelah larut pereaksi disimpan dalam botol gelap.

c) Pereaksi Mayer

1,36 gram Raksa(II) Klorida ditambah 5 gr KI dilarutkan dalam air suling hingga volume 10 ml, disimpan dalam botol gelap.

d) Identifikasi fenol dengan 1% ferriclorida

0,5 gram dilarutkan dalam aquades hingga volume 50 ml

e) Identifikasi Flavon dengan asam klorida pekat dan logam magnesium.

f) Saponin dengan pelarut aquades.

3.2.2.2. Pembuatan Peralatan yang Digunakan Untuk Kromatografi Kolom

Kolom kromatografi dengan diameter 3 cm dicuci lemaknya dengan asam sulfat. Kemudian dicuci bersih dengan detergen dan air suling kemudian dikeringkan. Setelah itu direndam dalam pelarut n-Heksan. Sebelum bubuk silika dimasukkan, kolom diisi pelarut 1/4 dari panjang kolom dan bagian bawah dialasi dengan kertas saring, baru kemudian bubuk dimasukkan. Kolom silika harus tetap terendam oleh pelarut n-Heksan, agar silika memadat, maka diketuk-ketuk dari luar serta dielusai terus menerus hingga memadat, dan kolom siap digunakan.

3.2.2.3. Pembuatan Ekstrak dari Daun *Artocarpus elasticus*

Kurang lebih 800 gram berat kering daun tanaman *Artocarpus Elasticus* dikeringkan dengan oven kemudian dibuat menjadi serpihan-serpihan kecil, dibungkus dengan kertas saring berbentuk gelondongan-gelondongan, kemudian diekstrak dengan alat soklet menggunakan pelarut n-Heksan. Hasil ekstrak dipekatkan dengan evaporator, diperoleh krude ekstrak berupa pasta berwarna hijau kehitaman seberat ± 9 gram.

3.2.2.4. Pemeriksaan Golongan Senyawa Terhadap Fraksi

Heksan

a) Pengujian adanya Triterpenoid dan Steroid

Sampel fraksi heksan dilarutkan dengan kloroform. Larutan diambil 10 tetes dan ditempatkan dalam plat tetes. Dibiarkan sampai kering setelah itu ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrida dan 1 tetes asam sulfat pekat. (Triterpenoid warna merah-ungu, steroid warna biru).

b) Pengujian adanya Alkaloid

Sampel dari fraksi heksan masukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan asam sulfat dengan konsentrasi 2 N sebanyak 10 tetes. Kemudian dikocok dengan teratur. Larutan bagian atas yang terdiri dari asam sulfat dan alkaloid dipipet dan dimasukkan pereaksi Mayer pada tabung satu dan yang lain ditambah pereaksi Wagner. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada penambahan pereaksi mayer.

c) Pengujian Adanya Saponin

Sampel fraksi heksan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah air hingga seluruh sampel terendam. Kemudian dididihkan selama 2 - 3 menit dan dinginkan. Setelah dingin dikocok kuat-kuat. Adanya buih yang stabil selama 30 mnt setelah pengocokan menunjukkan adanya saponin.

d) Pengujian Adanya Fenol

Sampel ditambahkan air suling dipanaskan hingga mendidih air rebusan dipipet, dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1% FeCl_3 . Ke-dalam tabung reaksi kemudian diamati adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam menunjukkan adanya senyawa fenol.

e) Pengujian Adanya Flavonoid

Sampel fraksi heksan (dalam bentuk pasta) ditambah metanol-air (1 : 1). Penyaringan dilakukan untuk memisahkan ekstrak tumbuhan kemudian dilakukan shinoda test. Dengan ditambah HCl pekat dan logam Mg, pada fraksi metanol-air. Adanya warna merah trilian (merah darah) menunjukkan adanya flavonoid.

3.2.2.5. Isolasi dan Pemurnian Kandungan Ekstrak

Sebelum dilakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan awal dengan KLT, sehingga dapat diidentifikasi banyaknya jenis senyawa. Serta dapat juga digunakan sebagai penentu jenis eluen yang digunakan.

Isolasi dilakukan dengan metode kromatografi kolom. Menggunakan sistem gradien pelarut dari non polar

ke polar (n-Heksan - Etil Asetat).Caranya adalah sebagai berikut :

Kira-kira 3 gram ekstrak sampel dibuat bubur dengan silika gel kemudian dimasukkan kedalam kolom yang telah padat. Kemudian dielusi dengan pelarut n-heksan, sampai diperoleh beberapa fraksi. Fraksi pertama, berwarna orange dikumpulkan. Karena fraksi kedua tidak bisa turun, maka ditambah dengan pelarut yang lebih polar yaitu etil asetat 5%, begitu seterusnya digunakan sistim gradien hingga perbandingan etil asetat - n-Heksan mencapai 90 %. Hasil kolom ditampung pada botol-botol 50 ml. Masing-masing di KLT dan disatukan berdasarkan kesamaan noda. Masing-masing fraksi diuapkan pelarutnya hingga tinggal 1/5 bagiannya, dan selanjutnya masing-masing fraksi diuji adanya senyawa triterpenoid.

Pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi menggunakan metanol. Mula-mula krude kristal dilarutkan dengan kloroform dibiarkan menguap, sesudah pelarut hilang ditambahkan metanol panas kemudian dipisahkan antara filtrat dan endapan. Filtrat didinginkan sehingga

terbentuk kristal warna putih. Proses rekristalisasi diulang-ulang hingga diperoleh hasil yang murni.

3.2.2.6. Analisis Hasil Isolasi dengan KLT Serta Uji Titik Leleh

Sesudah dilakukan rekristalisasi untuk menguji kemurnian dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dari berbagai pelarut, diantaranya n-Heksan, n-Heksan - kloroform (1:1), kloroform, etil asetat, etil asetat - n-Heksan 10%, 5%, metanol, metanol-kloroform (1:1). Selain itu dilakukan KLT 2 dimensi dengan menggunakan etil asetat - n-heksan 10% dan metanol.

Uji Titik leleh dilakukan dengan menggunakan "melting point Fiesher John."

3.2.2.7. Penentuan Struktur Senyawa Hasil Isolasi

Untuk penentuan struktur Senyawa hasil Isolasi digunakan metode spektroskopi. Spektrofotometri yang digunakan adalah spektrofotometri Ultra Violet, Infra Merah dan Massa.