

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada kulit batang buni, mengisolasi dan memperoleh struktur molekul organik senyawa metabolit sekunder dari fraksi N-heksana kulit batang buni (*A. bunius*).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Negeri Jakarta, Jl. Pemuda Rawamangun Jakarta Timur dan waktu penelitian dari bulan Juli 2010 sampai Juni 2011.

C. Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian kali ini adalah metode eksperimen yang meliputi tahapan ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi, partisi, dan kromatografi (kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom) untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder dari fraksi N-heksana kulit batang buni (*A. bunius*) kemudian dilakukan penentuan struktur molekul organik dengan menggunakan kromatografi gas-spektrometri massa (KG-SM).

D. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: alat-alat gelas, timbangan, lumpang porselen, corong pisah, kromatografi kolom, peralatan destilasi, peralatan kromatografi lapis tipis (KLT), rotary evaporator Eyela, dan kromatografi gas-spektrometer massa (KG-SM) Agilent Technologies 5973 tipe 6980N.

Bahan-bahan yang digunakan adalah: kulit batang pohon buni (*A. bunius*), aquades, berbagai pelarut dengan kualifikasi teknis (metanol dan N-heksana), pelarut dengan kualifikasi proanalisis *E. Merck* (etil asetat, N-heksana, metanol, diklorometana, etanol, kloroform, amoniak, isoamil alkohol dan aseton), silika gel *E. Merck* ukuran 0,2 – 0,5 mm, plat KLT silika gel F_{254} *E. Merck* ukuran 20 x 20 cm, berbagai reagen fitokimia yaitu Larutan H_2SO_4 , pereaksi dragendorff, Pereaksi meyer, larutan HCl pekat, serbuk magnesium, larutan $FeCl_3$ 1%, serum sulfat ($CeSO_4$) 2%, anhidrida asam asetat, dan asam asetat glasial.

E. Desain Penelitian

1. Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Bagian tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang pohon buni (*A. bunius*), yang diperoleh dari kebun raya Bogor, dan telah dilakukan penentuan spesimen tumbuhan di laboratorium Herbarium Bogoriense, Balai Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI Bogor Jawa Barat. Hasil dari penentuan spesimen terdapat dalam Lampiran 3. Sampel

kemudian dibersihkan, dipotong kecil-kecil dan dikering anginkan pada suhu 18⁰C kemudian sampel dihaluskan dengan menggunakan mesin penggiling hingga berbentuk serbuk. Diperoleh serbuk kering kulit pohon buni sebanyak 2,8 kg. Serbuk kering kulit pohon buni siap untuk proses selanjutnya.

2. Uji Fitokimia

Uji fitokimia terhadap senyawa metabolit sekunder dari kulit pohon buni (*A. bunius*) meliputi pengujian golongan alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, steroid, dan terpenoid. Bagan kerja dari uji fitokimia terdapat dalam Lampiran 1.

a. Pengujian Golongan Alkaloid

Serbuk kulit pohon buni sebanyak 4 gram ditambahkan 10 mL kloroform : amoniak (9:1), digerus lagi dan disaring. Filtrat ditambahkan dengan asam sulfat 1 M sebanyak 20 tetes, dikocok dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan bagian atas (asam) diambil, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi untuk selanjutnya ditambahkan dengan pereaksi meyer. Jika sampel mengandung alkaloid maka akan terbentuk endapan putih (Harborne.1986). Jika lapisan asam direaksikan dengan pereaksi dragendorf maka akan membentuk warna jingga-merah (Anwar dkk, 1994).

b. Pengujian Golongan Fenolik, Flavonoid dan Saponin

Serbuk kulit pohon buni sebanyak 4 gram dilarutkan dalam 25 mL air panas dalam gelas kimia yang dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring dan filtratnya ditampung dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan sedikit serbuk magnesium, 1 mL HCl pekat dan 1 mL amil alkohol. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan amil alkohol. Tabung kedua ditambahkan larutan FeCl_3 1%. Adanya senyawa fenolik ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau biru ungu. Tabung ketiga dikocok kuat, bila berbentuk busa selama 15 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl pekat menunjukkan adanya saponin (Harborne.1986).

c. Pengujian Triterpenoid dan Steroid

Serbuk kulit pohon buni sebanyak 4 gram ditambahkan 10 mL kloroform dan digerus lagi sampai halus, kemudian disaring. Filtrat diteteskan pada plat tetes dan kemudian dikeringkan. Selanjutnya ke dalam plat tetes ditambahkan 2-3 tetes anhidrida asam asetat dan diaduk, lalu ditambahkan 1-2 tetes asam sulfat pekat. Adanya senyawa steroid ditunjukkan terbentuknya warna hijau sampai biru. Adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah-ungu. Bila terdapat steroid dan terpenoid akan terbentuk warna merah dengan biru-ungu berbentuk cincin di tengah-tengah (Harborne.1986).

3. Isolasi

a. Maserasi

Isolasi dilakukan dengan cara maserasi dengan prosedur sebagai berikut: serbuk kulit pohon buni (*A. bunius*) sebanyak 2,8Kg dimaserasi dengan menggunakan 5 L metanol selama 3 hari. Selama perendaman dilakukan pengadukan setiap harinya untuk penyempurnaan pelarutan senyawa. Setelah 3 hari perendaman dilakukan penyaringan dan didapatkan filtrat. Ampas sampel direndam kembali selama 3 hari untuk mendapatkan filtrat dengan cara yang sama, maserasi dilakukan sampai didapat filtrat yang bening yaitu sebanyak sepuluh kali pengulangan. Filtrat yang diperoleh digabung dan selanjutnya pelarut diuapkan dengan rotary evaporator. Maka didapatkan ekstrak metanol dengan berat 508 gram.

b. Partisi Cair-cair

Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dipartisi dengan menggunakan N-heksana. Fraksi yang larut dalam metanol dan N-heksana kemudian diuapkan dengan rotary evaporator. Fraksi yang larut dalam N-heksana kemudian dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom.

c. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui jumlah komponen-komponen senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam

sampel dan mengetahui eluen yang tepat pada pemisahan dengan kromatografi kolom. Pada KLT, sampel dibuat dengan menggunakan fraksi N-heksana. Selanjutnya sampel ditotolkan menggunakan pipa kapiler dengan jarak 0,5 cm dari sisi bawah. KLT dilakukan dengan menggunakan berbagai eluen tunggal antara lain: metanol, etanol, aseton, etil asetat, kloroform, diklorometana dan N-heksana kemudian dilakukan KLT dengan menggunakan eluen kombinasi antara lain: etil asetat- N-heksana, dan aseton- N-heksana sampai diperoleh pemisahan yang baik. Selanjutnya plat dikeluarkan dari chamber dan dikeringkan di udara terbuka, kemudian bercak noda dideteksi dengan lampu UV, selanjutnya disemprotkan dengan pereaksi penampak noda, larutan FeCl_3 , CeSO_4 , dragendorf, dan lieberman burchard sampai diperoleh noda-noda yang terpisah dengan baik.

d. Kromatografi Kolom

Untuk memisahkan komponen-komponen senyawa metabolit sekunder dilakukan kromatografi kolom. Adsorben yang digunakan adalah silika gel. Kolom kromatografi dibuat dengan cara sebagai berikut: kolom yang telah dibersihkan diisi dengan sepertiga pelarut yang akan digunakan sebagai eluen. Silika gel yang telah disuspensikan dengan eluen dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam kolom agar diperoleh lapisan seragam. Eluen dibiarkan mengalir sehingga silika gel di dalam kolom menjadi padat dan rata permukaannya.

Fraksi N-heksana yang telah diimpregnasi dengan silika gel dimasukkan ke dalam kolom. Kemudian eluen dialirkan ke dalam kolom, masing-masing fraksi ditampung dengan botol yang ukurannya sama ± 25 mL, kemudian dilakukan KLT. Eluat yang mempunyai nilai Rf yang sama digabung untuk kemudian dilakukan kromatografi kolom kembali sampai semua komponen yang ada benar-benar terpisah.

e. Kristalisasi dan Rekristalisasi

Eluat hasil kromatografi kolom kemudian dimurnikan. Jika eluat berwujud cairan maka dilakukan kristalisasi. Hasil pemisahan kromatografi kolom yang telah berbentuk kristal selanjutnya dikristalkan kembali dengan cara sistem dua pelarut yang berbeda kepolarannya. Kristal yang diperoleh dilarutkan dalam pelarut hingga larut semua yang kemudian ditambahkan pelarut lain untuk menggeser kelarutan hingga keruh. Selanjutnya filtrat dipanaskan menggunakan penangas air untuk meningkatkan kelarutan, kemudian didinginkan beberapa waktu hingga terbentuk kembali kristal. Kristal dipisahkan dari sisa pelarut yang ada. Kemudian kristal dilarutkan kembali dan seterusnya dengan cara yang sama sampai diperoleh kristal yang murni.

4. Identifikasi Struktur Molekul

Senyawa hasil isolasi ditetapkan menggunakan kromatografi gas – spektrometri massa (KG-SM). Bagan kerja dari penelitian yang dilakukan dapat dilihat dari Lampiran 1.

